Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin Neukölln
Chefärztin Prof. Dr. I. Boll

Die Wirkung von gefroren - getautem, hitzebehandeltem, sowie gefroren - getautem und hitzebehandeltem Serumzusatz auf die Proliferation von CML - Blutkulturen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wendel, Eckhard
Stein - Neukirch

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549620_0014

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin Neukölln
Chefärztin Prof. Dr. I. Boll

Die Wirkung von gefroren - getautem, hitzebehandeltem, sowie gefroren - getautem und hitzebehandeltem Serumzusatz auf die Proliferation von CML - Blutkulturen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wendel, Eckhard
Stein - Neukirch

Referent: Prof. Dr. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. K.-P. Hellriegel

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17.04.1985

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	4
Fragestellung	9
2. Material und Methode	12
3. Ergebnisse	17
3.1. Klinik und Laborwerte der Blutspender	17
3.2. Mitose - Indices	24
3.3. Reifungskurven	39
3.4. Reifungsindices	58
3.5. Karyologische Kurven	62
3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse	64
4. Diskussion	65
5. Zusammenfassung der Arbeit	71
Literaturverzeichnis	72
Anhang	80
Lebenslauf	84

1. Einleitung

Die Granulozytopoese des Menschen ist ein System mit hohem Zellumsatz. Einerseits erfordert die kurze Lebensdauer der reifen Granulozyten einen ständigen Nachschub von Zellen aus dem Knochenmark, zum anderen ist das granulozytopoetische System bei einem Mehrbedarf (zum Beispiel bakterieller Infekt) zu einer enormen Leistungssteigerung befähigt. Um den Bedarf an reifen Granulozyten zu regulieren, sind komplexe Regelmechanismen erforderlich.

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden von vielen Autoren Stoffe beschrieben, welche die Ausschwemmung von Granulozyten aus dem Knochenmark fördern, und somit auf den Reservespeicher der Granulozytopoese einwirken: " Leukocytes Inducing Factor " (LIF) (Gordon 1960) (26), später wurde dieser Faktor von Metcalf (1971) " Leukocyte Releasing Factor " genannt (36). " Neutropoëtin " (Komiya 1959) (29), " Endogenes Pyrogen " (Wendt 1959) (53), " Granulomovin " (Ruhenstroth - Bauer 1964) (41), " Leukocytosis Promoting Factor " (Menkin 1955) (35), " Leukopoietin G " (Bierman 1964) (3) sind Stoffe, die ebenfalls in diese Kategorie einzuordnen sind. Wenn auch diese Substanzen zum Teil als Polypeptide erkannt sind, so ist doch deren genaue chemische Struktur weitgehend unbekannt.

Weiterhin fanden sich Hinweise auf die Existenz von Stoffen, welche auf den Proliferationsspeicher des Knochenmarks fördernd wirken (Poetine). Bierman (1972) (4) findet einen Faktor, der den Proliferationsspeicher der Granulozytopoese stimuliert, welchen er Granulopoietin nennt. Es handelt sich dabei um ein Globulin mit einem Mol-Gewicht (MG) von 25 000 - 75 000.
Boll (1969) (6) findet, daß humanes Serum bei entzündlichen Leukozytosen die Regeneration von granulozytären Vorstufen, gemessen am Mitose - Index , stimuliert, während

das Serum von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie auch die Reifung der normalen granulozytären Vorstufen, also die gesamte Proliferation der Granulozytopoese, in vitro hochsignifikant anregt.
Plasma von Leukapharese-Ratten enthält einen den Proliferationsspeicher der Granulozytopoese von Ratten-Knochenmark in vitro stimulierenden Faktor (Teir 1964) (52). Rytömaa (1968) findet im entzündlichen Rattenserum ein kurzfristig stimulierendes Antichalon anstatt des sonst die DNA und RNA Synthese hemmenden Chalons (43, 44). Chan (1971) (18) stellt im humanen Normalplasma nach der Dialyse gegen Wasser bzw. nach Ätherextraktion Aktivitäten fest, die die Bildung von granulozytopoetischen Kolonien in der Agarkolonietechnik nach Bradley und Metcalf (13) stimulieren und nimmt an, daß er durch diese Verfahren die in normalem Serum gleichzeitig vorhandenen Inhibitoren eliminiert hat.

Für die vorgenannte Agarkolonietechnik ist die Anwesenheit von Kolonie Stimulierenden Faktoren (CSF) eine unabdingbare Voraussetzung (Bradley und Metcalf 1966) (13) (Pluznik und Sachs 1966) (39). Ein Fehlen dieser Faktoren, die auch Kolonie stimulierende Aktivität (CSA) genannt werden wenn das verwendete Material nicht rein ist, führt zu einem rapiden Absterben der Kolonie bildenden Zellen bzw. zu einem Verlust der Proliferationskapazität (Burgess und Metcalf 1980) (17). CSF wird hier entweder von Granulozyten in einem sogenannten Feeder-layer gewonnen, oder durch Zusatz von kleinen Mengen menschlichen Serums oder Urins den Kulturen beigegeben.

Es existieren mittlerweile eine Vielzahl von Veröffentlichungen über verschiedene Quellen des CSF. So gewinnen Lusis, Quon und Golde (1981) (34) CSF mit einem MG von 34 000, welches ein saures Glykoprotein darstellt und Granulozyten- und Makrophagen-Kulturen stimuliert, aus menschlichen T-

Lymphoblasten bei Hairy-Cell Leukämie. Greenberg und Steed (1981) (28) gewinnen CSA aus Milzzellen von Patienten mit Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphomen sowie mit akuter myeloischer Leukämie (AML). Als CSA produzierende Zellen werden B-Lymphozyten und O-Zellen identifiziert. CSA konnte jedoch in dem von Milz-Zellen von Patienten mit CML konditionierten Medium nicht nachgewiesen werden.
Kurland et al. (1978) (30) gewannen CSF von Mäuse-Peritonealmakrophagen und menschlichen Blut-Monozyten welche in vitro die Proliferation von determinierten myeloischen Stammzellen stimulierten. Hohe Anzahlen von Monozyten-Makrophagen hatten jedoch eine geringere Stimulationsaktivität und wirkten merklich suppressiv aufgrund eines dialysierbaren nicht Spezies-spezifischen Inhibitors der Proliferation, welcher mit einem sensitiven Radio-Immuno-Essay als Prostaglandin E identifiziert wurde.

Bolin und Robinson (1979) (5) beschreiben einen Serumfaktor, der die Kapazität besitzt, menschlische polymorphkernige Leukozyten zu einer gesteigerten CSA-Synthese zu stimulieren. Es handelt sich dabei um ein hitzelabiles Protein mit einem höheren Molekulargewicht als CSA. DiPersio et al. (1980) (20) weisen nach, daß GCT, eine menschliche monozytenähnliche Zell-Linie, CSA Aktivitäten freisetzt, die als Perjodat sensitive Proteine mit kritischen Disulfid-Brücken erscheinen. Eine von diesen verschiedenen CSA Aktivitäten, welche das Wachstum von neutrophilen, neutrophil-monozytären und eosinophilen Kolonien aus menschlichem Knochenmark stimuliert und ein Molekulargewicht von 30 000 hat, kann durch Antikörper gegen humanes Urin-CSF neutralisiert werden. Die CSA wird ferner durch Perjodat-Behandlung inaktiviert und war hitzeresistent bei 56°C für 2 Stunden. Behandlung mit 75°C ergab eine 15 prozentige Aktivitätsverminderung, Behandlung mit 90°C führte zwar zum fehlenden Wachstum von Kolonien, es wurde jedoch noch die Bildung von Clustern gefördert.

Viele Forscher vertreten die Ansicht, daß dem CSF aufgrund der Stimulation der determinierten Stammzelle, die Funktion eines physiologischen Regulators (Granulopoietin) zukommt, es ist jedoch noch nicht gelungen nachzuweisen, ob er auch in vivo eine Regulationsfunktion hat.

Aufgrund der Tatsache, daß die stimulierenden Faktoren der Granulozytopoese im Blut, nicht wie bei der Erythropoese bei der Verminderung der reifen Zellen, sondern bei deren Vermehrung, die höchste Aktivität zeigen, entwickelt Robinson (1972) (40) die Theorie eines positiven Rückkopplungsmechanismus der Granulozytopoese und stützt diese mit dem Argument, daß die Leukozytenzahl beim bakteriellen Infekt immer weiter ansteigt, obwohl die Zahl der Granulozyten im Blut bereits erhöht ist.

Im Gegensatz zu dieser Theorie des positiven Feedback vertreten viele Autoren die Ansicht, daß die Zell-Proliferation durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert wird, übertragen von einem Hemmstoff, welcher Chalon genannt wird. Der Ausdruck Chalon,in dieser speziellen Bedeutung, wurde 1962 von Bullough geprägt und meint einen humoralen Hemmstoff, der nicht gewebstoxisch, die Proliferation reversibel hemmend und gewebsspezifisch aber nicht artspezifisch wirkt. Erstmals nachgewiesen wurde die Existenz eines Chalons in der Epidermis der Maus von Bullough und Laurence (1960) (16). Rytömaa und Kiviniemi (1967) (42) weisen mit Hilfe der 3 H - Thymidin Markierungsmethode ein Granulozytenchalon nach. Sie zeigen, daß der Einbau von 3H-Thymidin in die DNS von unreifen granulozytopoetischen Zellen, durch Extrakte von reifen Granulozyten, kurzfristig vermindert und somit die Proliferation der myelopoetischen Zellen spezifisch gehemmt wird.

Bei dem Granulozytenchalon handelt es sich vermutlich um ein saures Peptid mit einem Molekulargewicht von 500-600

(Paukovits, Hinterberger 1978) (37), welches spezifisch auf die granulozytopoetischen Zellen wirkt, alle zur Mitose fähigen Zellen einschließlich der determinierten Stammzelle (Myeloblast) hemmt und über Proteinrezeptoren an der Oberfläche der Zielzellen wirkt. Boll et al. (1977) (9)finden nach 6 - 24 Stunden eine signifikante Senkung des Granuloblasten Mitose - Index in humanem Knochenmark durch von der Ratte gewonnenes Chalon ohne Zytotoxizität und ohne Wirkung auf die Erythroblasten. Das Granulozytenchalon wirkt vermutlich über eine Verlängerung des Zell - Zyklus. Lord (1975) (32) weist nach, daß die Verlängerung der Zell - Zyklus Zeit durch Granulozytenchalon hauptsächlich auf einer Verlängerung der G1 - Phase beruht. Rytömaa (1978) (47) stellt die Überlegung an, daß, angenommen die Entwicklung vom Myeloblasten zum reifen Granulozyten würde 10 Mitosen umfassen, bei einer übersprungenen Mitose, also einer Verlängerung der Zell - Zyklus Zeit um 10 Prozent, bereits der Ausstoß an reifen Zellen halbiert würde. Er unternimmt den Versuch 7 Patienten mit akuter und chronischer myeloischer Leukämie mit gereinigtem Granulozytenchalon zu behandeln und beobachtet in 6 von 7 Fällen eine Hemmung des Leukämie - Wachstums, in 5 Fällen folgte dieser Hemmung eine aktuelle Regression der Leukämie und in einem Fall führte die Behandlung zu einer kompletten Remission der Krankheit (Rytömaa et al. 1976, 1977) (45, 46).

Neben dem Granulozytenchalon wurden noch andere Inhibitoren der Granulozytopoese nachgewiesen, unter anderem nicht dialysierbare Lipoproteine, welche CSF inaktivieren (Chan et al. 1971) (18), ferner sog. Colony inhibiting activity (CIA), welche aus polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) freigesetzt wird und auf die Kolonie stimulierenden Zellen wirkt indem sie die Freisetzung von CSF hemmt (Broxmeyer et al. 1977) (14). Granulozyten von CML - Patienten waren in ihrer CIA Produktion normalen Neutrophilen unterlegen. CML - CIA war spezifisch in seiner nicht toxischen Wirkung

auf CSF produzierende Zellen. Ein anderer festgestellter Effekt war, daß die Zielzellen bei CML weniger empfindlich gegenüber geringen Konzentrationen von CIA waren als normale Zielzellen. Pelus et al. (1979) (38) weisen nach, daß Prostaglandin E die Differenzierung von determinierten Stammzellen hemmt und daß Laktoferrin aus Granulozyten die Produktion von CSA, welches auf Makrophagen-, Neutrophilen- und gemischte Kulturen stimulierend wirkt, aus Makrophagen hemmt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sehr viele Hinweise auf Faktoren existieren, welche die Proliferation der Granulozytopoese steuern, möglicherweise existiert ein dualer Feedback - Mechanismus (Shadduck 1971) (48), es erscheint aber auch durchaus denkbar, daß die Granulozytopoese einem weitaus komplexeren Regulationsprinzip gehorcht, welches an vielen Stellen ineinandergreift. Leider gibt es für die meisten der beschriebenen Faktoren keine gesicherten Aussagen über deren Wirkung in vivo.

Fragestellung

Interessant wäre nun herauszufinden, wie sich die Regulationsmechanismen bei myeloproliferativen Erkrankungen verhalten. Boll et al. (11) untersuchten das Wachstum von normalen Knochenmarkzellen in autologem Serum verglichen mit dem Wachstum in 0,4 ml/ml gefroren-aufgetautem Serum von Patienten mit CML. Andererseits wurde das Wachstumsverhalten von Knochenmarkzellen von Patienten mit CML in autologem Serum im Vergleich zu normalem Serum untersucht. Dabei fanden sich folgende Ergebnisse: Seren von CML-Patienten erhöhten die Mitosefrequenz von normalen Knochenmarkzellen auf 120 - 140 Prozent. In 2 von 3 Experimenten war hitzebehandeltes Serum von Patienten mit CML genauso aktiv wie unbehandeltes Serum dieser Patienten. Obwohl CML-Serum die normalen Knochenmarkzellen stimulierte, korrelierte die

Mitosefrequenz von CML - Knochenmarkzellen, die in autologem Serum kultiviert wurden, mit dem niedrigen in vivo Wert (70 % verglichen mit normalen Zellen). Wurden dagegen CML - Knochenmarkzellen in normalem Serum kultiviert, hatten sie einen erhöhten Mitose - Index verglichen mit der Kultur in autologem Medium (130 %). In Korrelation zu dem erhöhten Mitose - Index erhöhte sich die relative Anzahl von normalen granulozytären Vorstufen, die noch teilungsfähig waren, kontinuierlich über alle drei Kulturtage, wenn sie mit CML - Serum kultiviert wurden. Ebenso erhöhte sich die Anzahl von granulozytären Vorstufen von CML - Knochenmark, welches in normalem Serum kultiviert wurde, korrespondierend mit dem erhöhten Mitose - Index.

In der hier vorliegenden Arbeit wird nun das Wachstumsverhalten von Blutzellen von CML - Patienten
1. in gefroren - getautem autologem Serum,
2. in hitzebehandeltem autologem Serum,
3. in autologem Serum, welches beiden Behandlungen unterworfen wurde,

im Vergleich zu frischem autologem Serum untersucht, um festzustellen, ob im frischen Serum Inhibitoren vorhanden sind, die durch Tieffrieren oder Hitzebehandlung ihre Wirkung verlieren und ob sich die Vorstufen der Granulozytopoese im Blut proliferativ verhalten wie die granulozytären Vorstufen im Knochenmark.

Die hier verwendete Suspensionskulturtechnik hat gegenüber der Agarkulturtechnik den Vorteil, daß eine längere Kultivierung möglich ist und daß das Verhalten der Zellen demjenigen in vivo zumindest in den ersten 24 Stunden sehr ähnlich ist (31), wohingegen bei der Agarkulturtechnik insbesondere die polymorphkernigen Granulozyten viel schneller als in vivo ausreifen und auch schneller zugrunde gehen (19). Für ein optimales Zellwachstum ist es wichtig eine bestimmte Zelldichte zu erreichen und diese für alle

Versuche konstant zu halten (10). Die meisten Autoren verwenden dabei Zelldichten von 1 000 000 bis 7 000 000 Zellen/ ml (51, 54). In dieser Arbeit wurde eine Zelldichte von 2 000 000 / ml angewendet.

2. Material und Methode

Material

Für die vorliegenden 9 Versuche wurde Blut von 5 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie verwendet.

Methode

Kulturansatz

Vor der Blutentnahme wurde die hierzu verwendete Spritze mit Heparin ausgespült. Das gewonnene Blut wurde im Verhältnis 1 : 6 mit Macrodex^{R} (6 %ig) verdünnt. Anschließend ließ man die Erythrozyten sedimentieren und saugte die so entstandene Zellsuspension (Plasma mit kernhaltigen Zellen) in ein steriles Gefäß ab. Der Kulturansatz erfolgte am nächsten Tag, da das tiefgefrorene Eigenserum über 24 Stunden bei - 20 °C gelagert wurde, während die übrigen Seren in dieser Zeit bei + 4-6 °C im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Die Kulturen wurden folgendermaßen angesetzt, wobei die Zellsuspension mit Hilfe von RPMI - Medium, welches 200 mg% Glucose enthielt, auf etwa 2 x 10^{6} Zellen/ml im Gesamtansatz eingestellt wurde:

Kultur mit frischem Serum:	0,4 ml Eigenserum frisch 0,6 ml Zellsuspension in autologem Plasma + RPMI 1 Tropfen Strepto B Lösung (Streptomycin + Ampicillin im Verh.1 :2)
Kultur mit gefroren-getautem Serum:	0,4 ml Eigenserum gefroren-getaut 0,6 ml Zellsuspension in autologem Plasma + RPMI 1 Tropfen Strepto B Lösung

Kultur mit hitzebeh. Serum:	0,4 ml Eigenserum hitzebehandelt 0,6 ml Zellsuspension in autologem Plasma + RPMI 1 Tropfen Strepto B Lösung
Kultur mit gefroren-getautem und hitze-behandeltem Serum:	0,4 ml Eigenserum gefroren-getaut und hitzebehandelt 0,6 ml Zellsuspension in autologem Plasma + RPMI 1 Tropfen Strepto B Lösung

Das Eigenserum war zuvor wie folgt behandelt worden:

ES frisch:	24 Stunden bei + 4-6 °C im Kühlschrank gelagert
ES gefroren:	24 Stunden bei - 20 °C tiefgefroren
ES hitzebeh.:	20 Min. bei 37 °C inkubiert 30 Min. im Eiswasser 30 Min.bei 56 °C inkubiert
ES gefroren und hitzebehandelt:	24 Stunden bei - 20 °C tiefgefroren anschließend gleiche Behandlung wie ES hitzebehandelt.

Von allen Kulturen wurden nach 48 und 72 Stunden Proben entnommen, zur Stunde 0 wurde das frische Blut ausgewertet. Von jeder Stichprobe wurden mit Hilfe der Zytozentrifuge 2 Ausstriche hergestellt (500 U/Min. = 22 x g, 5 Min.)

Auswertung

Von jeder Stichprobe eines Versuches (Std. 0, 48 und 72) wurden ca 2000 Zellen und die dazugehörigen Mitosen nach den von Boll (7, 8) beschriebenen Kriterien differenziert.

Somit liegt der Arbeit die Zählung von insgesamt etwa 126 000 Zellen zugrunde. Folgende Parameter der Proliferationskinetik wurden untersucht.

Mitose - Indices in Promille für Granuloblasten

Der Mitose - Index errechnet sich aus der Zahl der Mitosen auf 1000 teilungsfähige Zellen. Zu den teilungsfähigen Zellen der Granulozytopoese werden gezählt: Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten sowie Monoblasten und Promonozyten.

Reifungskurven

Additiv aufgetragen zeigen sie die Differentialverteilung der verschiedenen Zellen in Abhängigkeit von der Kulturdauer.

Reifungsindex

Dieser Index ist ein Kriterium für den Grad der Ausreifung der weißen Reihe. Er errechnet sich aus dem Verhältnis von Granuloblasten zu Granulozyten (Gb/Gz) wobei die Grenze zwischen Metamyelozyten und Stabkernigen gezogen wird.

Karyologische Kurven

stellen die Mitosephasenverteilung in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der Mitosen dar.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Chi^2 - Verfahrens für zwei Merkmale bei zweifacher Stufung angestellt (4-Felder-Chi^2-Test) (23), dabei werden voneinander abhängige Merkmale für einen bestimmten Zeitpunkt zwischen Kontrollansatz und Versuchsansatz miteinander verglichen

Formel: $$Chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

wobei $\sum$ die Summe, B den Beobachtungswert und E den nach der Nullhypothese zu berechnenden Erwartungswert darstellen. Der zu Chi^2 bei einem Freiheitsgrad (= Vergleich von 2 Werten) gehörende p-Wert (propability) wurde aus einer Graphik (1) abgelesen. Der Unterschied zweier zu vergleichender Werte ist dann ausreichend von Null verschieden und somit signifikant, wenn p unter einer bestimmten Grenze liegt. In dieser Arbeit gelten alle p-Werte
kleiner 0,01 als signifikant,
kleiner 0,001 als hochsignifikant,
kleiner 0,05 größer 0,01 als fraglich signifikant und
größer 0,05 als nicht signifikant.

Rechenbeispiel:

Signifikanzberechnung Gb/Gz-Index frisch/hitzebeh. 48 h

	B_{Gb}	B_{Gz}	B_{Gb+Gz}	E_{Gb}	E_{Gz}
frisch	6487	8304	14791	6985,72	7805,28
hitze	6921	6677	13598	6422,28	7175,72
Summe	13408	14981	28389		

frisch: $$E_{Gb} = \frac{13408 \times 14791}{28389} = 6985,72$$

$$E_{Gz} = 14791 - 6985,72 = 7805,28$$

hitze: $$E_{Gb} = \frac{13408 \times 13598}{28389} = 6422,28$$

$$E_{Gz} = 13598 - 6422{,}28 = 7175{,}72$$

		$B - E$	$(B - E)^2$	E
frisch:	$B_{Gb} - E_{Gb}$	$= -498{,}72$	$248721{,}64$	$: 6985{,}72 = 35{,}60$
	$B_{Gz} - E_{Gz}$	$= 498{,}72$	$248721{,}64$	$: 7805{,}28 = 31{,}87$
hitze:	$B_{Gb} - E_{Gb}$	$= 498{,}72$	$248721{,}64$	$: 6422{,}28 = 38{,}73$
	$B_{Gz} - E_{Gz}$	$= -498{,}72$	$248721{,}64$	$: 7175{,}72 = 34{,}66$

$$\Sigma \frac{(B - E)^2}{E} = 140{,}86$$

$Chi^2 = 140{,}86$

der dazugehörige p-Wert ist kleiner als 0,001, das heißt das Ergebnis ist hochsignifikant.

3. Ergebnisse

3.1. Klinik und Laborwerte der Blutspender

Versuch 1

Patient W.M., weibl., geb. am 29.7.1948
Blutentnahme am 15.12.1980
Diagnose: chronisch myeloische Leukämie (CML) seit 1975 bekannt.
Therapie: 6 x 2 mg Busulfan / Woche

Blutbild und Differentialblutbild vom 20.1.1981

Hb	13,1 g%
Ery	4,61 Mio. / Mikroliter
HbE	28,2 pg
Leuko	10 100 / Mikroliter
Thrombo	288 000 / Mikroliter

Eos.	2 %
Bas.	2 %
Myelobl.	1 %
Promy.	1 %
Myc.	1 %
Meta.	1 %
Stab.	3 %
Segm.	68 %
Mono.	3 %
Ly.	18 %

Versuch 2

Patient H.N., weibl., geb. am 22.8.1918
Blutentnahme am 10.2.1981

Diagnosen: CML seit Juli 1980 bek., thrombopenische Purpura, rez. Otitis media li und Sinusitis li.

Klinik: multiple Petechien am ganzen Körper, Milz 3 Querfinger unter Rippenbogen, Leber 3 Querfinger unterhalb Rippenbogen.

Therapie: 3 x 1 Eßl. Mixtura pepsini / d
1 Tbl. Primobolan^{R} 5 mg / d
1 Tbl. Novodigal^{R} / d

Labor: direkter Coombs-Test schwach positiv
BSG 170 / 175 n. Westergren
ALP negativ

Blutbild vom 20.2.1981

Hb	8,4 g%
Ery	2,57 Mio. / Mikroliter
Hk	27,2 Vol. %
MCV	105 fl
HbE	29,4 pg
Leuko	130 000 / Mikroliter
Thrombo	22 000 / Mikroliter

Differentialblutbild vom 13.2.81

Leuko	175 000 / Mikroliter
Eos.	0 %
Bas.	1 %
Myelobl.	1 %
Promy.	7 %
Myc.	23 %
Meta.	12 %
Stab.	7 %
Segm.	39 %
Ly.	4 %
Mono.	1 %
Promono.	5 %

Versuch 3

Patient H.N., weibl., geb. am 22.8.1918
Blutentnahme am 24.3.1981
Diagnosen: CML, thrombopenische Purpura
Therapie: 1 Tbl. Novodigal^{R}/ d
1 Tbl. Primobolan^{R} 5 mg / d
1 Tbl. Dytide H^{R}/ d
80 mg Urbason^{R}/ d

Blutbild und Differentialblutbild vom 27.3.1981

Hb	8,1 g%
Ery	2,5 Mio. / Mikroliter
Hk	22,7 Vol. %
MCV	89 fl
HbE	32 pg
Leuko	21 000 / Mikroliter
Thrombo	21 000 / Mikroliter

Eos.	0 %
Bas.	2 %
Myelobl.	3 %
Promy.	3 %
Myc.	3 %
Meta.	9 %
Stab.	17 %
Segm.	30 %
Ly.	13 %
Monobl.	3 %
Promono	8 %
Mono.	5 %
AMZ	4 %

Versuch 4

Patient W.F., männl., geb. am 25.7.1908
Blutentnahme am 5.5.1981
Diagnosen: CML, Hyperlipämie, Myokardinsuffizienz
Therapie: 3 x 2 mg Busulfan / Woche

Blutbild und Differentialblutbild vom 7.5.1981

Hb	14,5 g%
Hk	46,6 Vol. %
Ery	5,29 Mio. / Mikroliter
HbE	27,4 pg
Leuko	13 600 / Mikroliter
Thrombo	152 000 / Mikroliter

Eos.	2 %
Bas.	6 %
Myelobl.	0 %
Promy.	2 %
Myc.	5 %
Meta.	5 %
Stab.	5 %
Segm.	59 %
Ly.	12 %
Mono.	3 %
AMZ	1 %

Versuch 5

Patient H.K., männl., geb. am 1.5.1903
Blutentnahme am 5.5.1981
Diagnose: CML

Blutbild und Differentialblutbild vom 23.3.1981

Hb	9,8 g%
Hk	30,7 Vol. %
Ery	4,02 Mio. / Mikroliter
HbE	24,1 pg
Leuko	9 400 / Mikroliter

Eos.	9 %
Bas.	0 %
Myelobl.	0 %
Promy.	3 %
Myc.	1 %
Meta.	1 %
Stab.	7 %
Segm.	69 %
Ly.	9 %
Mono.	1 %

Versuch 6

Patient F.B., weibl., geb. am 23.1.1905
Blutentnahme am 5.5.1981
Diagnosen: CML, Hypertonie
Therapie: 1 Tbl. Dytide H^{R}/ d
1,5 Tbl. Novodigal^{R}/ d
2 x 1 Kps. Maycor ret.^{R}/ d

Blutbild und Differentialblutbild vom 11.5.1981

Hb	8,7 g%
Hk	30,5 Vol. %
Ery	3,28 Mio. / Mikroliter
Leuko	92 000 / Mikroliter

Eos.	4 %
Bas.	4 %
Myelobl.	5 %
Promy.	11 %
Myc.	7 %
Meta.	6 %
Stab.	18 %
Segm.	44 %
Ly.	1 %

Versuch 7

Patient W.F., männl., geb. am 25.7.1908
Blutentnahme am 2.6.1981
sonstige Daten siehe Versuch 4

Versuch 8

Patient F.B., weibl., geb. am 23.1.1905
Blutentnahme am 2.6.1981
Diagnosen: CML, Hypertonie
Therapie: 6 x 10 Tropfen Novalgin^{R}/ d
2 x 1 Kps. Maycor ret.^{R}/ d
1 Tbl. Dytide H^{R}/ d
1,5 Tbl. Novodigal^{R}/ d
1 Tbl. Zyloric^{R}/ d

Blutbild und Differentialblutbild vom 2.6.1981

Hb	8,8 g%
Hk	30,0 Vol. %
Ery	3,26 Mio. / Mikroliter
Leuko	119 000 / Mikroliter

Eos.	0 %
Bas.	6 %
Myelobl.	3 %
Promy.	9 %
Myc.	8 %
Meta.	12 %
Stab.	18 %
Segm.	30 %
Ly.	12 %
Mono.	2 %

Versuch 9

Patient W.M., weibl., geb. am 29.7.1948
Blutentnahme am 2.6.1981
sonstige Daten siehe Versuch 1

3.2. Mitose-Indices (Tabelle 1, Abb. 1-11)

3.2.1. Kulturen mit frischem Eigenserum
(Vers. 1-9, Abb. 1-9)

Die Mitose-Indices der Kulturen mit frischem Eigenserum sind, mit Ausnahme von Versuch 3 und dem 48-Stunden-Wert von Versuch 4, sehr niedrig, wie es bei der chronisch myeloischen Leukämie im Blut zu erwarten ist (siehe Tab. 1).
Versuch 3 zeigt in allen Ansätzen einen deutlich erhöhten Mitose-Index. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Patientin vor der Blutentnahme mit Urbason behandelt wurde (Abb. 3).
In Abbildung 3 wurde aus darstellungstechnischen Gründen ein nur halb so großer Maßstab verwendet wie in den anderen Abbildungen.
Im Durchschnitt steigen die Mitose-Indices nach 48 Stunden deutlich an, um nach 72 Stunden wieder leicht abzufallen.

3.2.2. Kulturen mit Serumzusatz gefroren-getaut
(Vers. 1-6, Abb. 1-6)

Die Mitose-Indices der Kulturen mit Serumzusatz gefroren-getaut liegen zu allen Zeiten deutlich über den Mitose-Indices der Kulturen mit frischem Serum. Die Durchschnittswerte steigen bei 48 Stunden von 11,6 auf 29,8 Promille, bei 72 Stunden sogar von 8,1 auf 34,0 Promille. Die Signifikanzberechnung ergibt sowohl für den 2. als auch für den 3. Kulturtag p-Werte kleiner 0,001 und somit ein hochsignifikantes Ergebnis.

3.2.3. Kulturen mit Serumzusatz hitzebehandelt
(Vers. 1-9, Abb. 1-9)

Die Mitose-Indices der Versuche mit Serumzusatz hitzebehandelt zeigen im Vergleich zu den Kulturen mit frischem

Serum keine eindeutigen Änderungen. Zwar liegen die Durchschnittswerte aller neun Versuche etwas höher als bei den Kontrollkulturen, aber die Streuung der Einzelwerte ist sehr groß. Die Signifikanzberechnung ergibt mit p-Werten von 0,2 für 48 Stunden und 0,42 für 72 Stunden keine signifikante Abweichung.

3.2.4. Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt (Vers. 7-9, Abb. 7-9)

Die Mitose-Indices der drei Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt liegen in allen Fällen über den Werten der Kulturen mit frischem Serum. Die Berechnung ergibt für den 2. Kulturtag mit p = 0,01 ein signifikantes Ergebnis. Für den 3. Kulturtag ist der p-Wert kleiner als 0,001 und damit das Ergebnis hochsignifikant. Die mittleren Mitose-Indices für die Kulturen mit Serumzusatz gefroren-hitzebehandelt wurden getrennt von den mittleren Mitose-Indices der übrigen Versuche (Abb. 10) in Abb. 11 dargestellt. Als Vergleichskulturen wurden hier nur die Kulturen mit frischem Serum der Versuche 7-9 herangezogen, da in den vorhergehenden Versuchen die Mitose-Indices zum Teil in allen Kulturen wesentlich höher lagen und dort keine Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt vorlagen.
Im Vergleich zu den Kulturen mit Serumzusatz hitzebehandelt ergibt sich für den 2. Kulturtag kein signifikanter Unterschied, am 3. Kulturtag liegen die Mitose-Indices jedoch eindeutig höher (P kleiner 0,01 = signifikant).
Die Kulturen mit Serumzusatz gefroren zeigen hochsignifikant höhere Mitose-Indices als die Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt (p jeweils kleiner 0,001).

In Tabelle 1 werden die Ergebnisse der Signifikanzberechnung im Vergleich von behandeltem Serum zu unbehandeltem Serum mit Hilfe folgender Symbole dargestellt:

signifikant erhöht ↑

hochsignifikant erhöht ↑↑

nicht signifikant →

Tab. 1: Mitoseindices aller Versuche [in ‰]

Vers.	Orig. 0 h	ES-frisch 48h	ES-frisch 72 h	gefroren 48 h	gefroren 72 h	hitzebeh. 48h	hitzebeh. 72 h	gefr + hitze 48 h	gefr + hitze 72 h
1	0	7,8	3,6	14,6	5,0	2,0	0		
2	1,2	7,4	3,2	12,6	25,3	17,4	8,5		
3	0	35,6	39,2	87,3	86,2	54,5	66,3		
4	0	22,9	11,7	25,9	38,0	5,7	0,9		
5	0	15,5	4,7	22,2	22,2	17,1	8,5		
6	0	3,2	0	16,4	27,0	6,8	5,1		
7	0	4,8	5,1			10,3	4,4	16,6	13,4
8	0	2,4	4,5			4,3	4,9	7,0	12,7
9	0	4,6	1,2			1,2	3,5	6,6	6,5
$\sum$	1,2	104,2	73,2	179,0	203,7	119,3	102,1	30,2	32,6
ϕ	0,13	11,6	8,1	29,8	34,0	13,3	11,3	10,1	10,8
alle Mit. / alle GB		9,2	4,9	21,5	25,1	11,6	6,0	10,0	11,2
Signifik.				↑↑	↑↑	→	→	↑	↑↑

Abb.1: Mitoseindices

Versuch 1

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " gefroren
—— —— " " " hitzebeh.

Abb. 2: Mitoseindices

Versuch 2

Abszisse: Kulturzeit in Stunden

Ordinate : MI in ‰

———— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " gefroren
—— —— " " " hitzebeh.

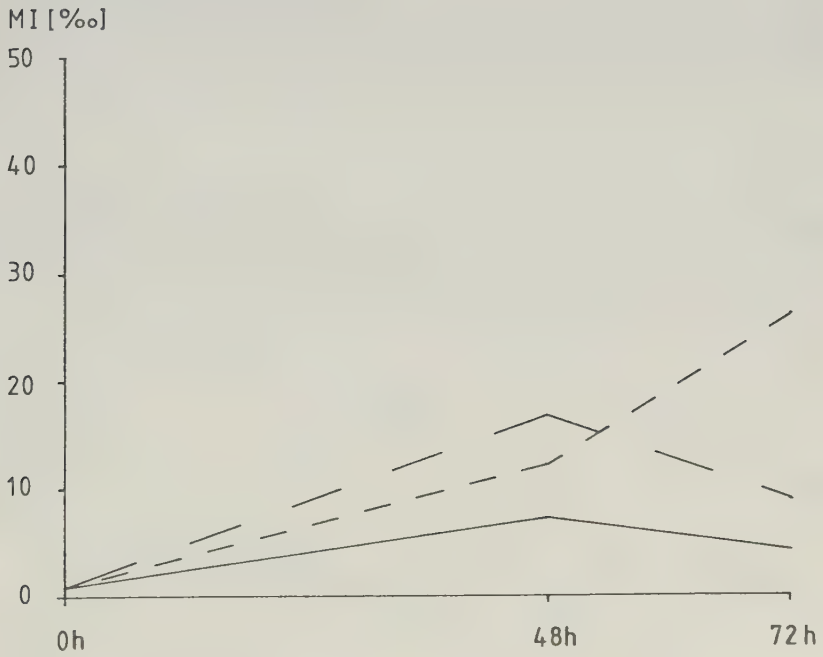


Abb. 3: Mitoseindices

Versuch 3

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

———————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " gefroren
—— —— " " " hitzebeh.

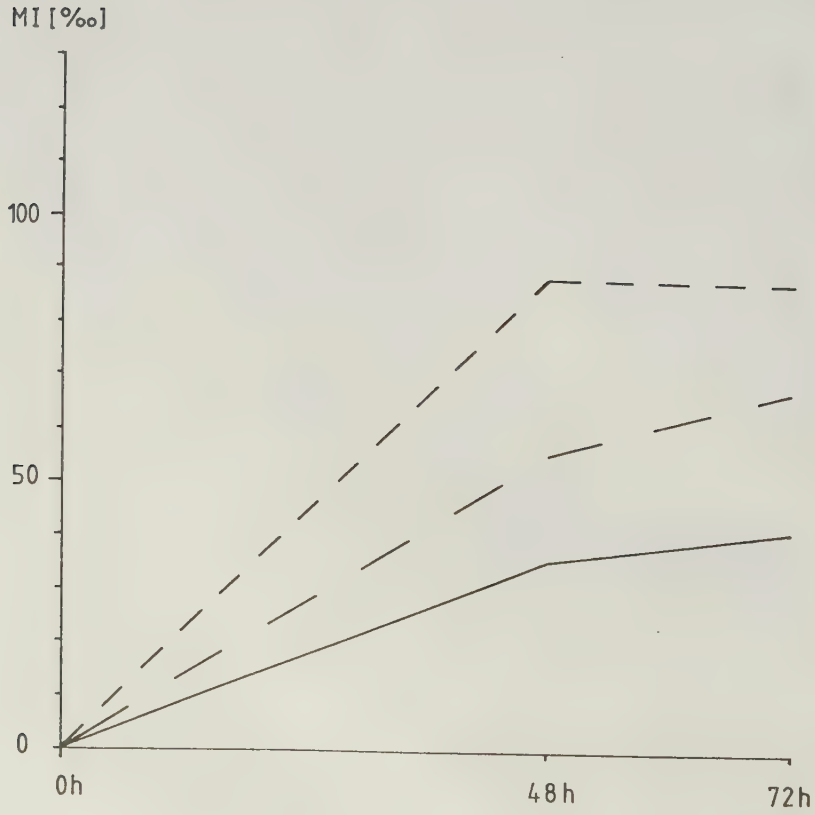


Abb. 4: Mitoseindices

Versuch 4

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " gefroren
—— —— " " " hitzebeh.

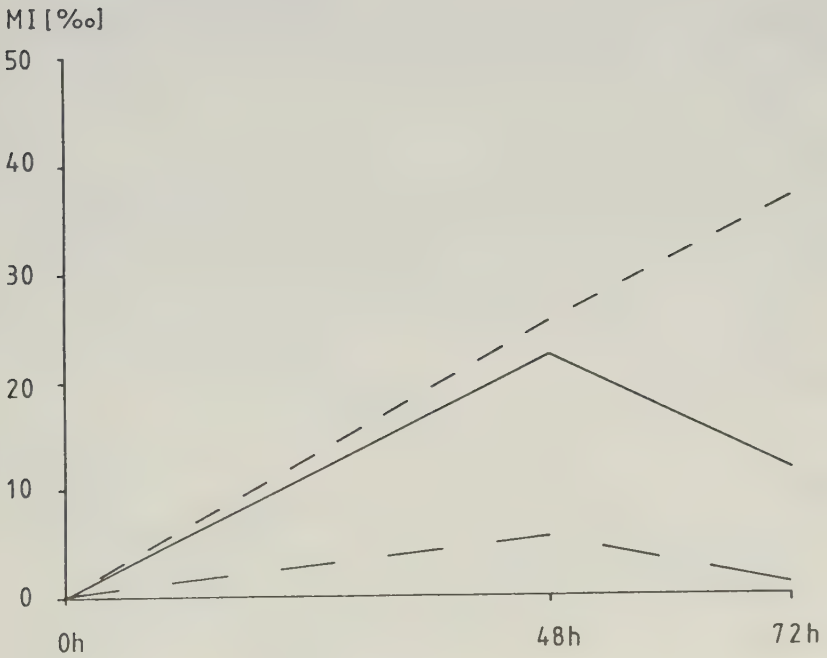


Abb.5: Mitoseindices

Versuch 5

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " gefroren
—— —— " " " hitzebeh.

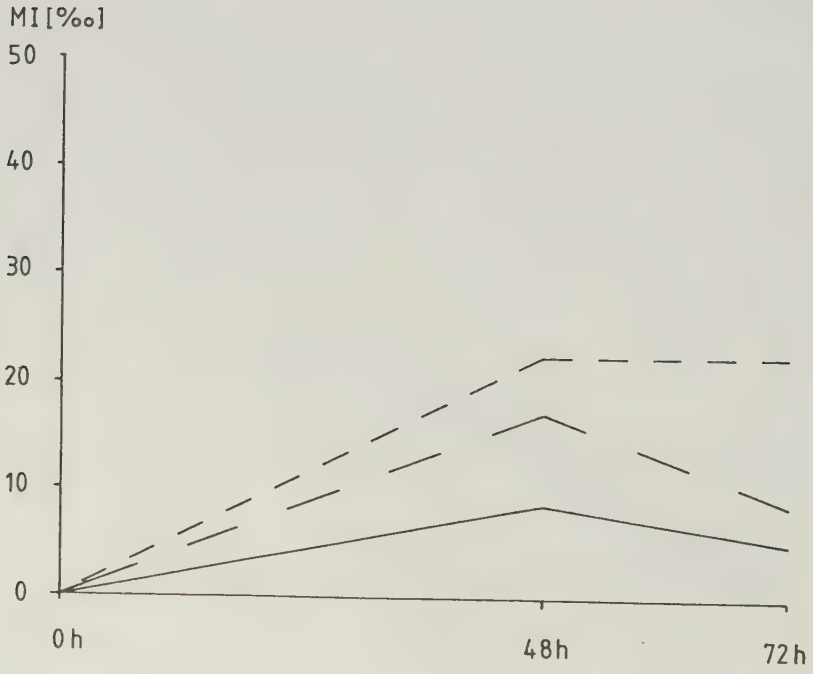


Abb.6: Mitoseindices

Versuch 6

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " gefroren
—— —— " " " hitzebeh.

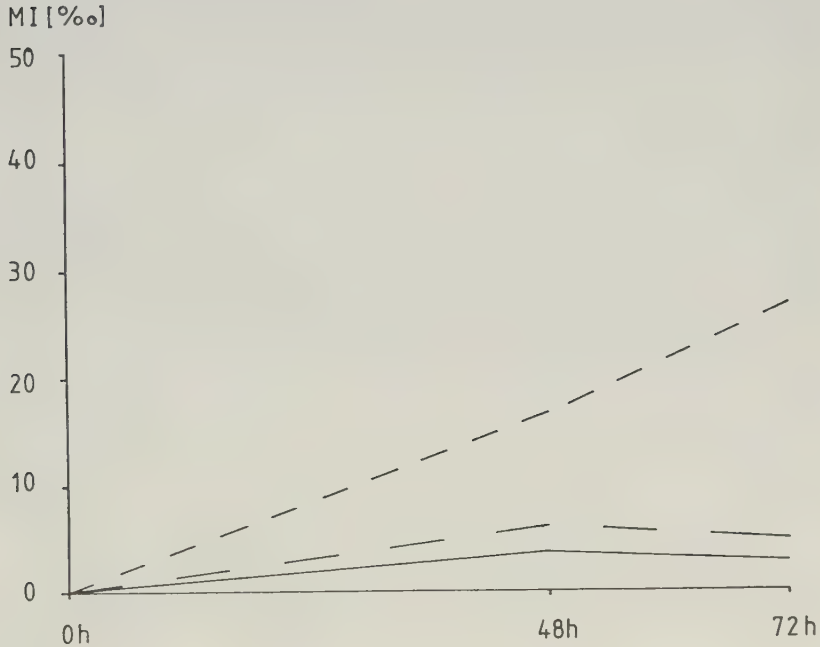


Abb.7: Mitoseindices

Versuch 7

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " hitzebeh.
——— · ——— " " " gefr.+hitzebeh.

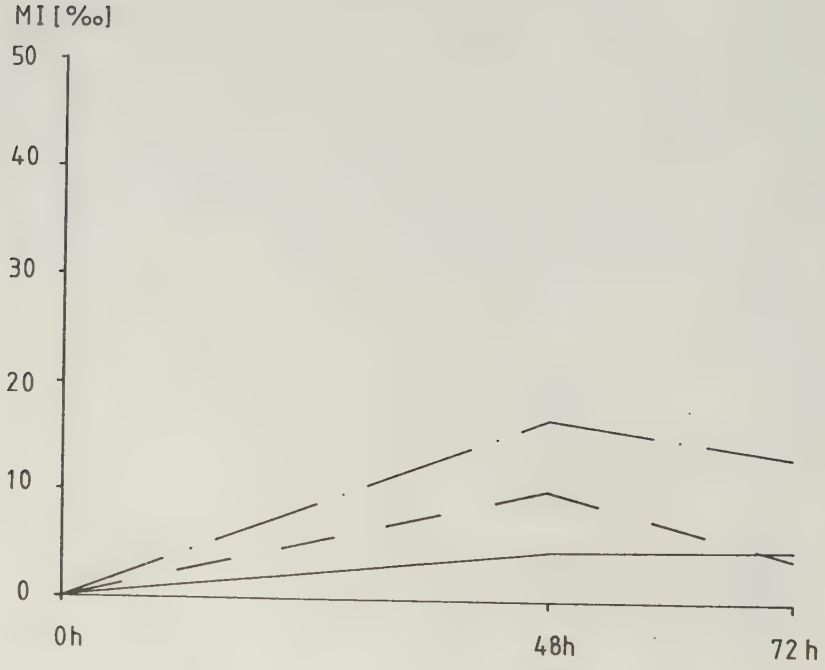


Abb.8: Mitoseindices

Versuch 8

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
—— —— —— " " " hitzebeh.
———— · ———— " " " gefr.+hitzebeh.

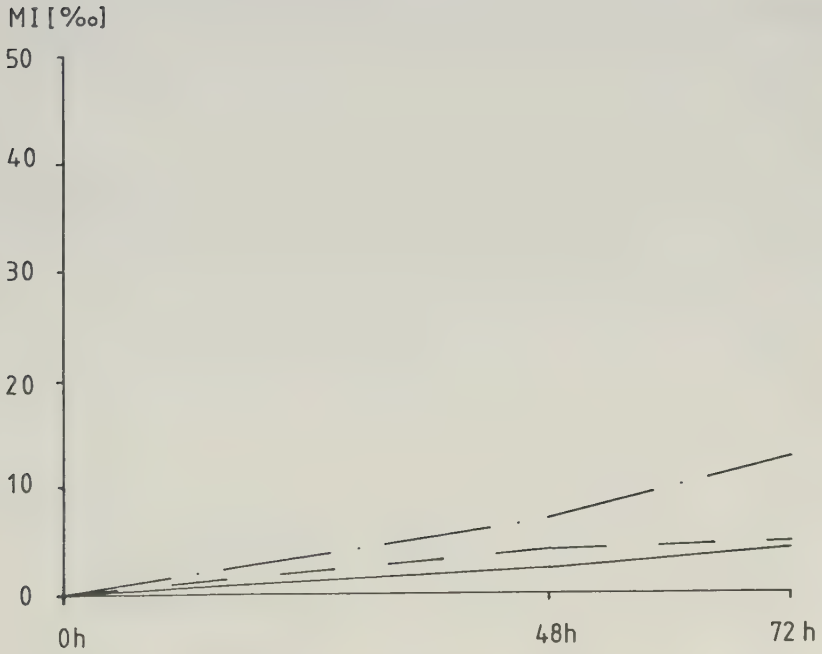


Abb.9: Mitoseindices

Versuch 9

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " hitzebeh.
——— . ——— " " " gefr+hitzebeh.

Abb.10: Mittlere Mitoseindices

Versuch 1 - 9

Abszisse : Kulturzeit in Stunden
Ordinate : MI in ‰

——————— Kulturen mit Serum frisch

— — — " " " gefroren

—— —— " " " hitzebeh.

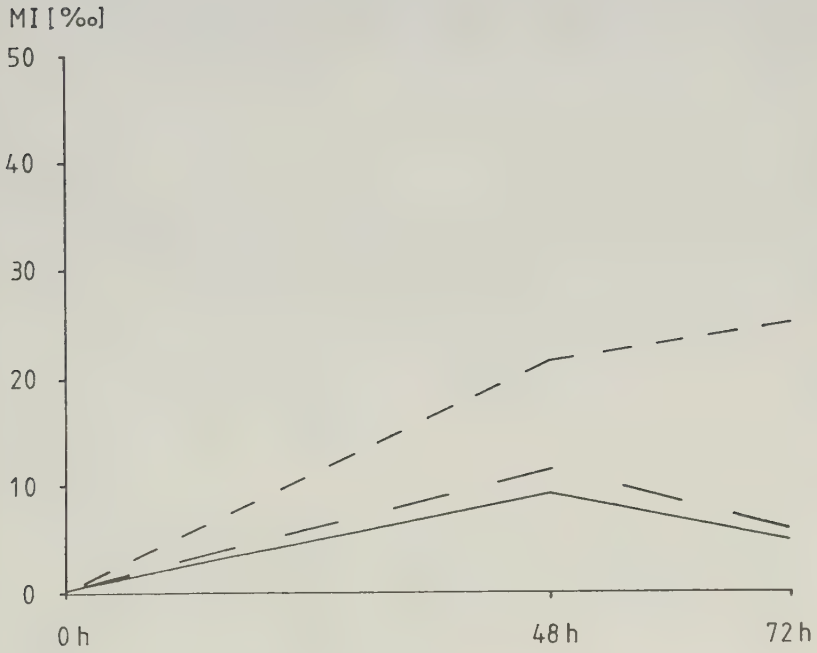


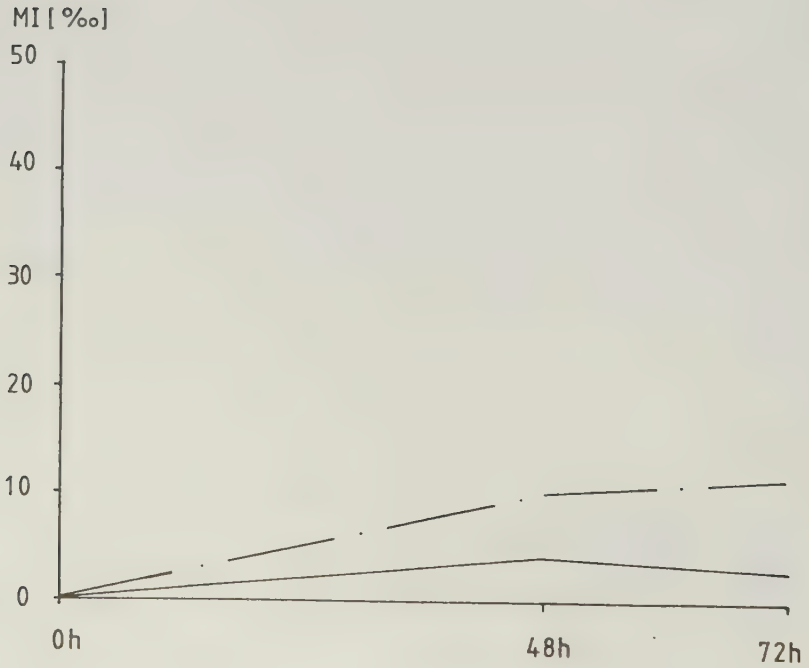
Abb.11: Mittlere Mitoseindices

Versuch 7 – 9

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: MI in ‰

——————— Kulturen mit Serum frisch

——— . ——— " " " gefr. + hitzebeh.



3.3. Reifungskurven

3.3.1. Serumzusatz gefroren
(Vers. 1-6, Abb. 12-17)

An den Reifungskurven läßt sich für die Kulturen mit Serumzusatz gefroren für den 2. Kulturtag in 4 von 6 Fällen eine beschleunigte Ausreifung gegenüber den Kulturen mit frischem Serum ablesen. Versuch 1 und 2 bilden eine Ausnahme. Für den 3. Kulturtag läßt sich eine noch stärkere Beschleunigung der Ausreifung feststellen, wobei Versuch 1 und 4 eine Ausnahme bilden. Bemerkenswert ist, daß sich am 2. Versuchstag in den Versuchen 4,5 und 6 trotz beschleunigter Ausreifung eine starke Zunahme der Promyelozyten zeigt.

3.3.2. Serumzusatz hitzebehandelt
(Vers. 1-9, Abb. 18-26)

Die Reifungskurven der Versuche mit Serumzusatz hitzebehandelt zeigen gegenüber den Kulturen mit frischem Serumzusatz eine deutlich verzögerte Ausreifung. Versuch 5 bildet, wie auch bei den Reifungsindices, eine Ausnahme.

3.3.3. Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt
(Vers. 7-9, Abb. 27-29)

Die Reifungskurven der Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt verlaufen fast identisch mit den Kurven der Kulturen mit frischem Serumzusatz. Es zeigt sich zwar am 3. Kulturtag in 2 von 3 Versuchen eine leichte Verzögerung der Ausreifung, die sich aber, wie die Signifikanzberechnung der Reifungsindices ergibt, als nicht signifikant herausstellt. (s.a. Abb. 30)

Abb.12: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 1

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — Kultur mit Serumzusatz gefroren

Mb = Myeloblasten
Pm = Promyelozyten
M = Myelozyten
Mm = Metamyelozyten
St = Stabkernige
Pmk = Polymorphkernige Zellen

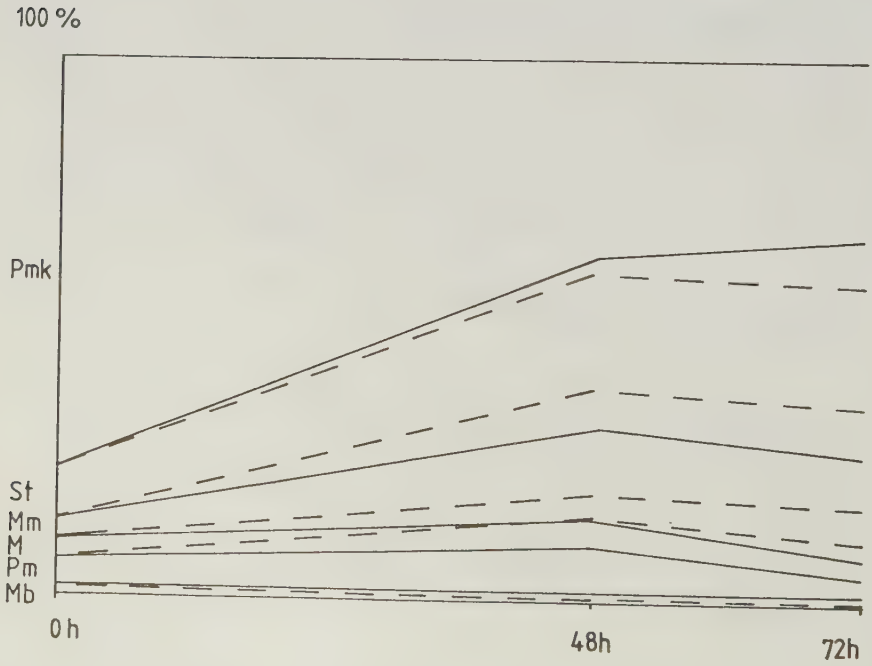


Abb. 13: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 2

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — Kultur mit Serumzusatz gefroren

sonst. Erl. wie Abb. 12

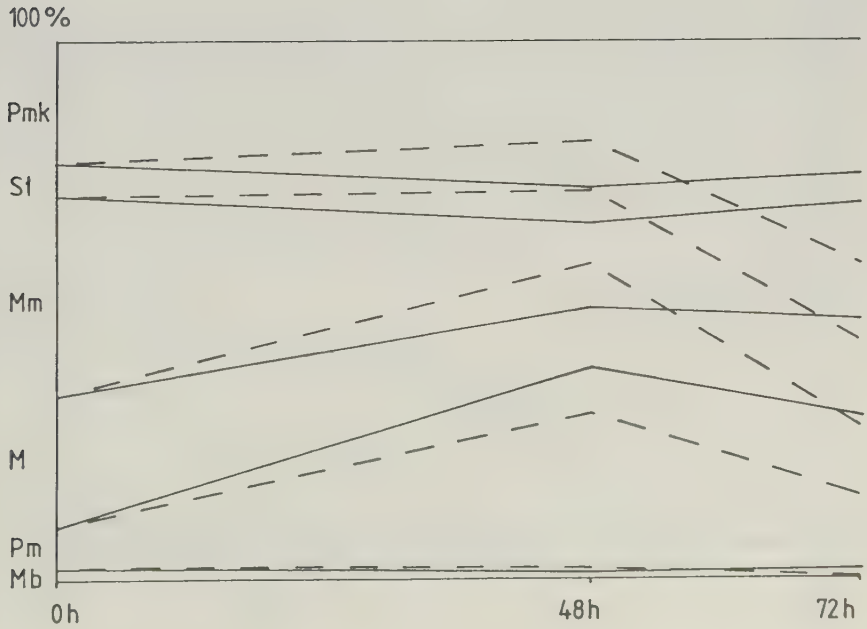


Abb. 14: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 3

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — Kultur mit Serumzusatz gefroren

sonst. Erl. wie Abb. 12

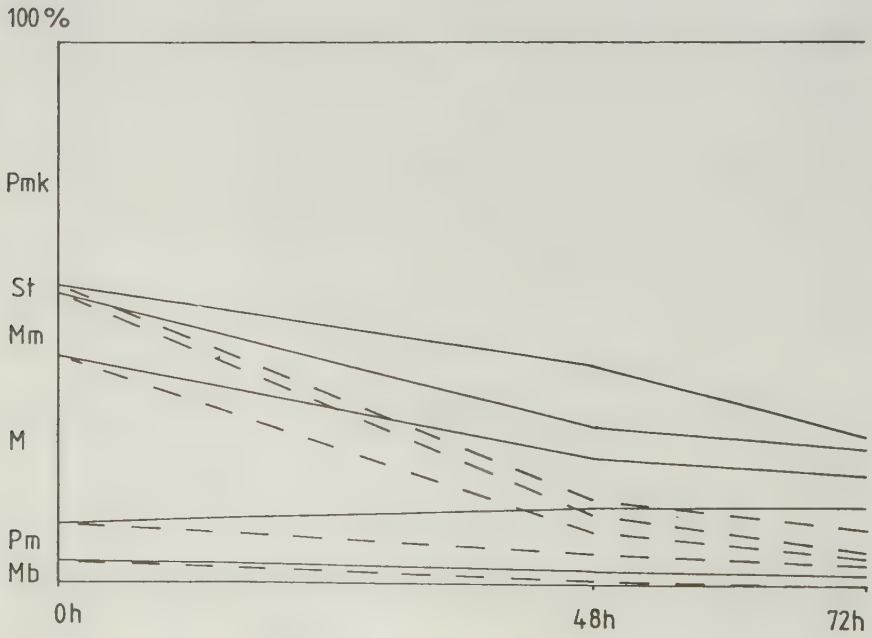


Abb.15: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 4

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — Kultur mit Serumzusatz gefroren

sonst. Erl. wie Abb.12

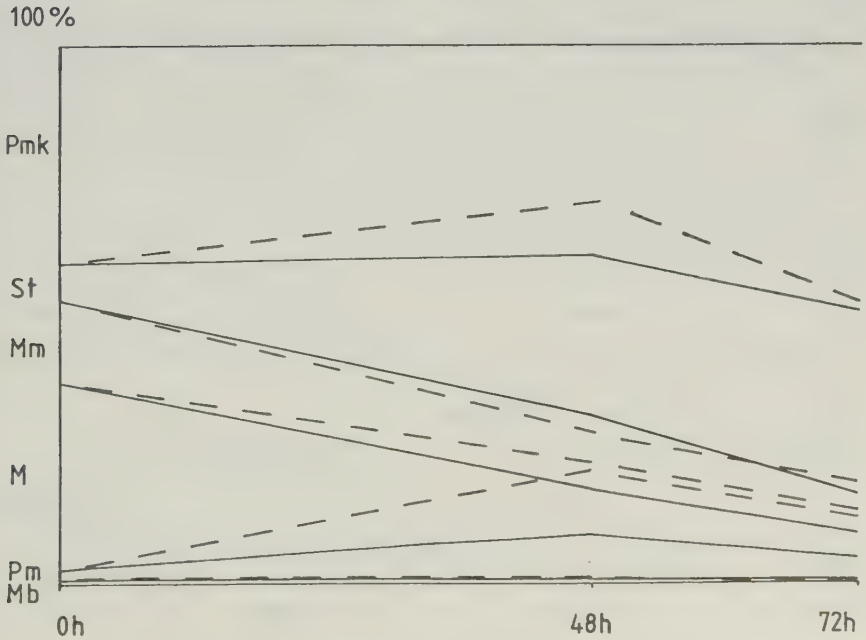


Abb.16: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 5

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — Kultur mit Serumzusatz gefroren

sonst. Erl. wie Abb.12

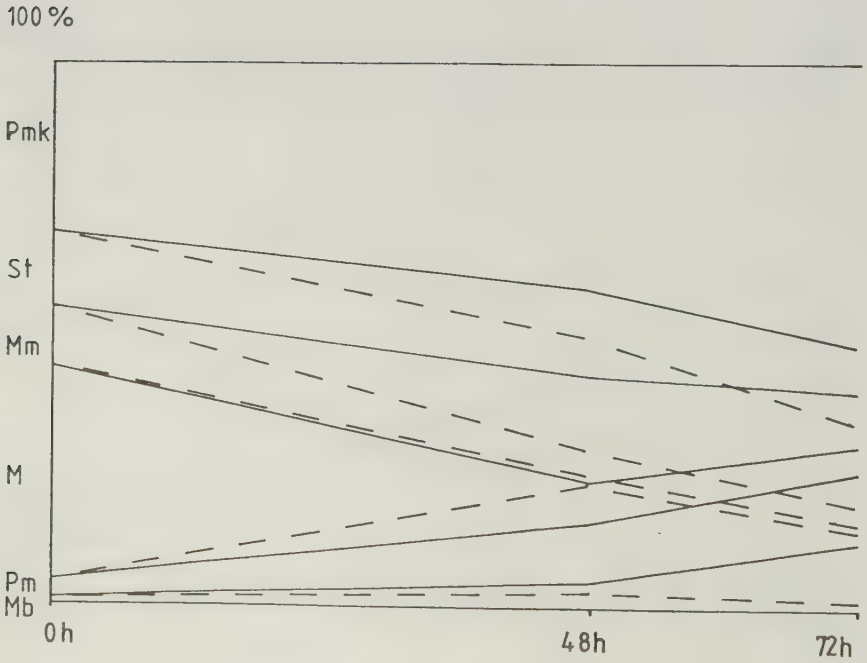


Abb.17: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 6

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch
— — — " " " gefroren

sonst. Erl. wie Abb. 12

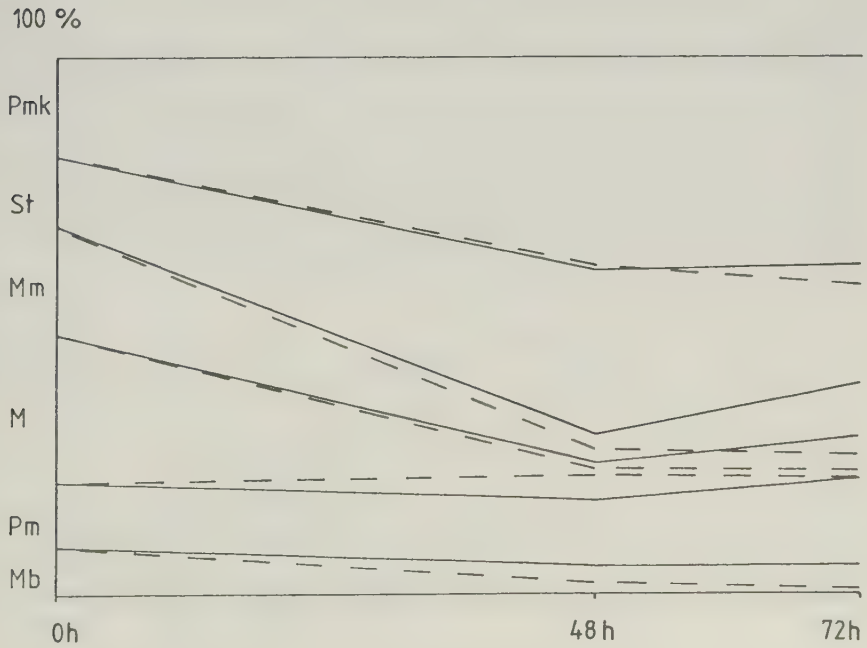


Abb. 18: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 1

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch
—— —— Kultur mit Serumzusatz hitzebeh.

Mb = Myeloblasten
Pm = Promyelozyten
M = Myelozyten
Mm = Metamyelozyten
St = Stabkernige
Pmk = Polymorphkernige Zellen

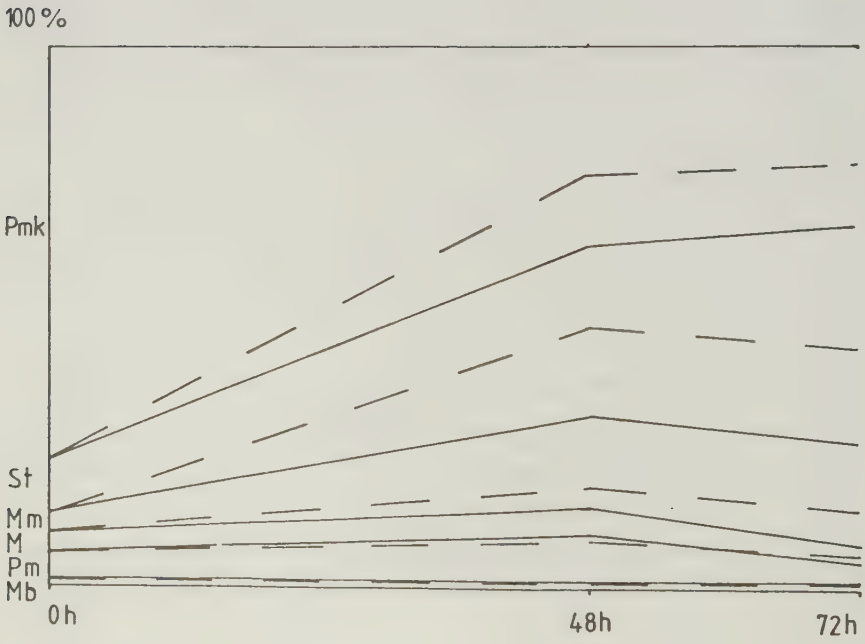


Abb.19: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 2

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch

—— —— Kultur mit Serumzusatz hitzebeh.

sonst. Erl. siehe Abb. 18

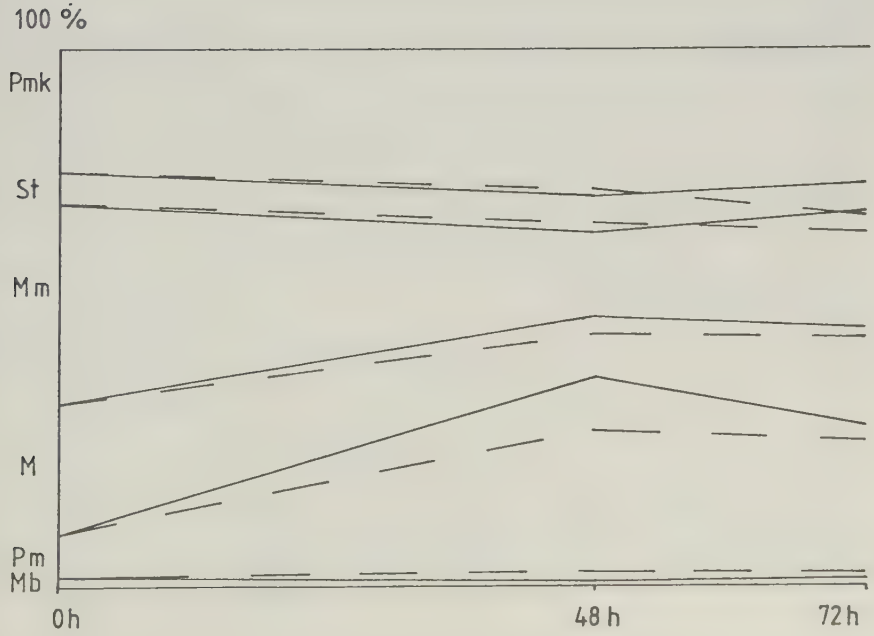


Abb.20: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 3

Abszisse : Kulturzeit in Stunden
Ordinate : Zellartin %

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch

—— —— Kultur mit Serumzusatz hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb.18

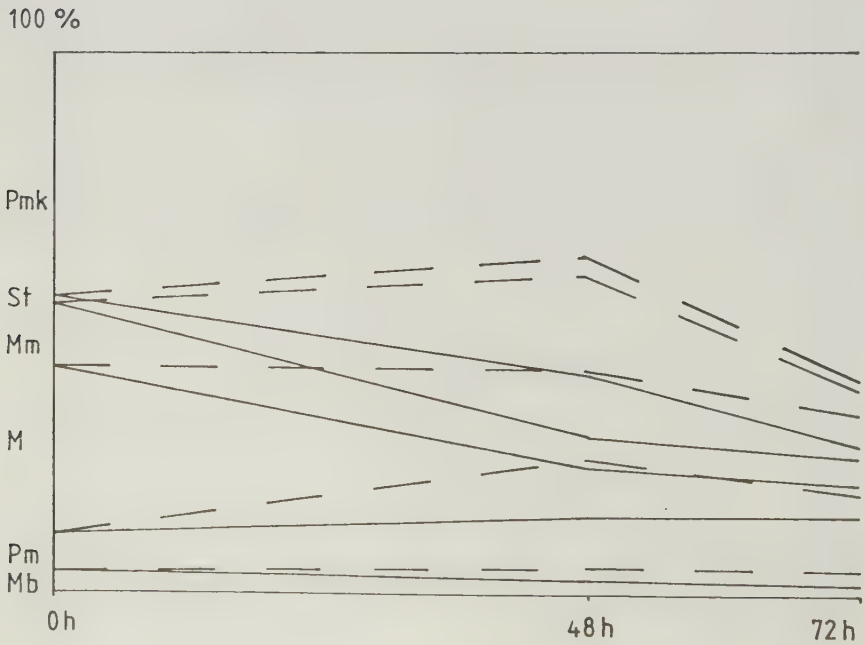


Abb. 21: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 4

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch

—— —— " " " hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb. 18

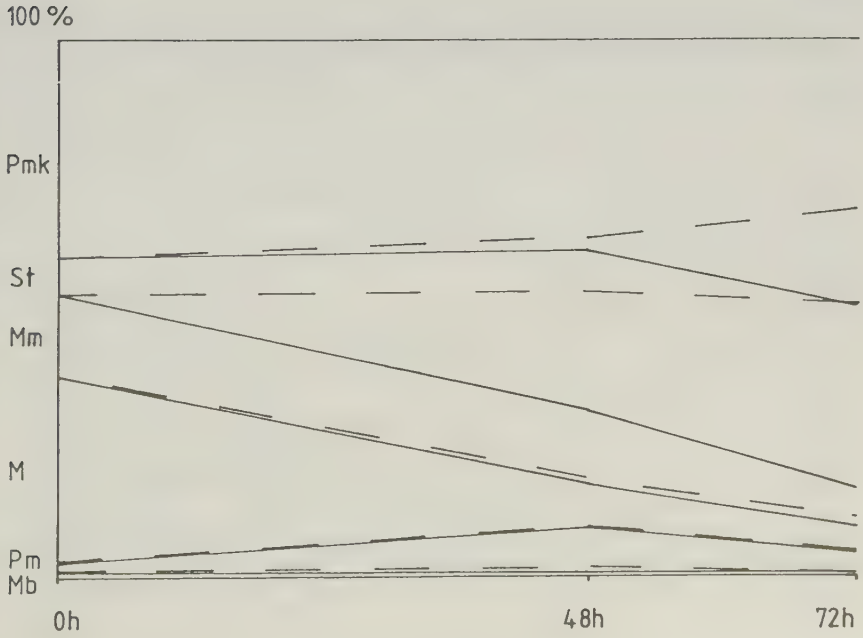


Abb.22 : Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 5

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch

—— —— " " " hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb. 18

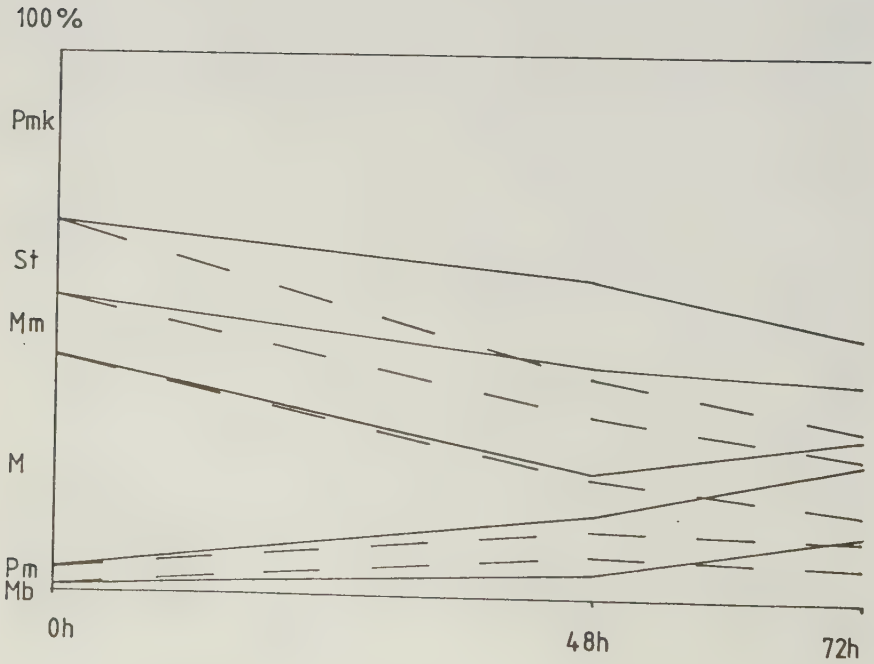


Abb.23: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 6

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch

—— —— " " " hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb. 18

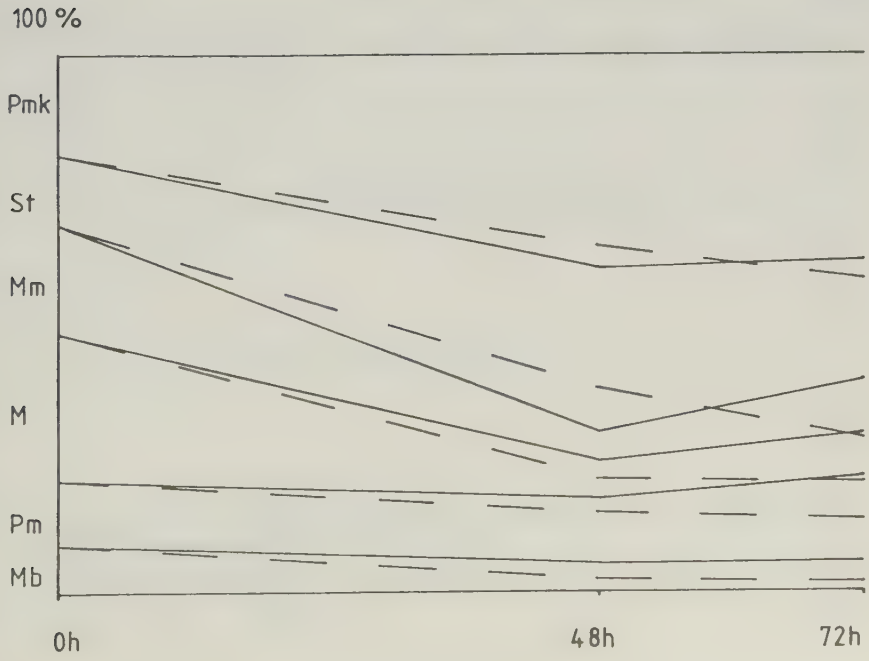


Abb. 24: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 7

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate : Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch

— — — — " " " hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb. 18

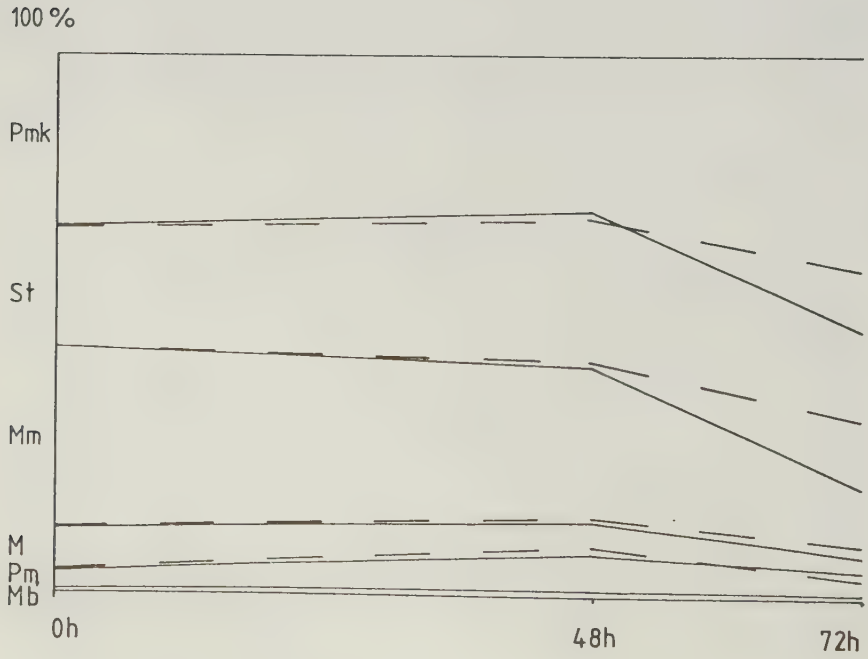


Abb.25: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 8

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch

—— —— " " " hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb.18

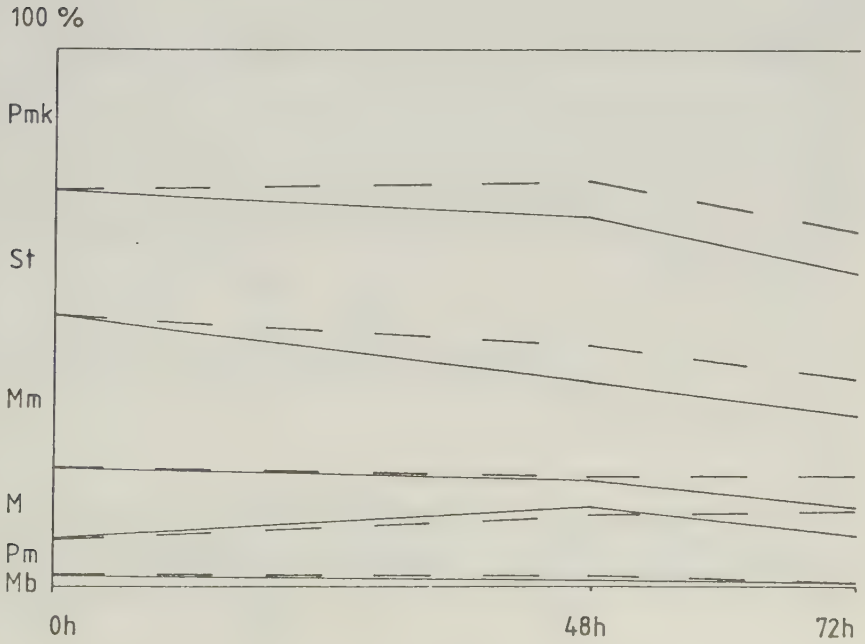


Abb.26: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 9

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

———— Kultur mit Serumzusatz frisch

—— —— " " " hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb.18

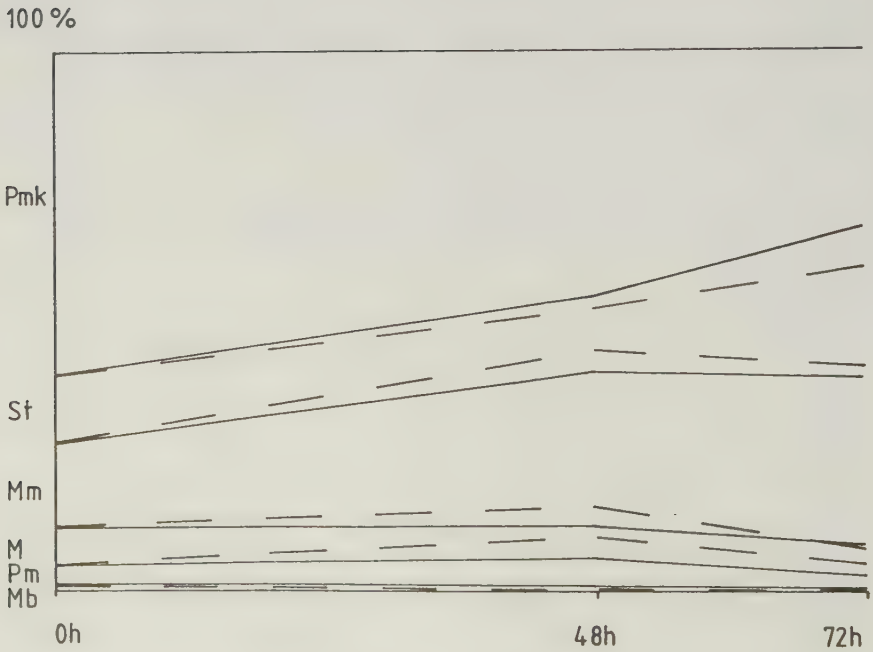


Abb. 27: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 7

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Zellart in %

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch

——— · ——— " " " gefr.+hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb. 18

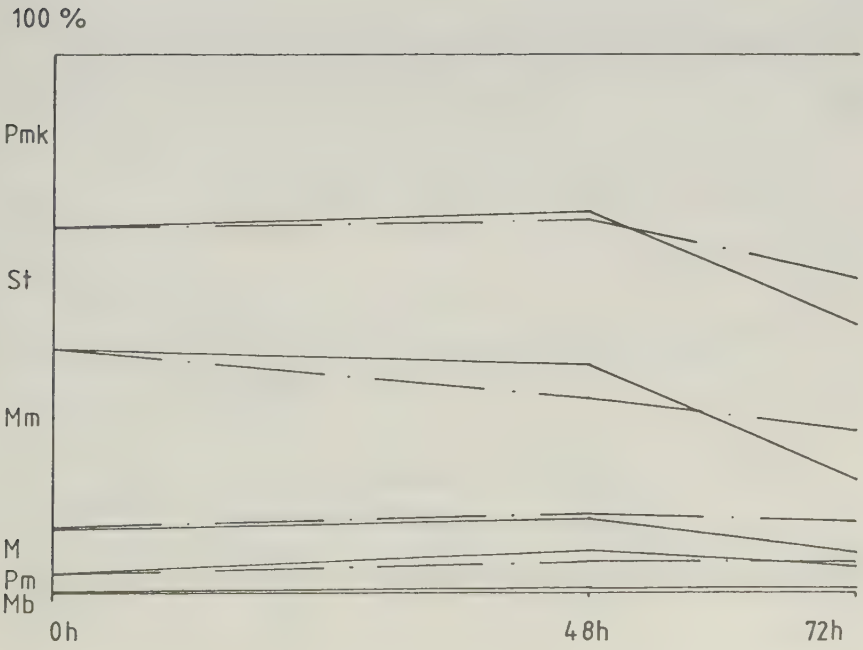


Abb.28: Reifungskurven, additiv aufgetragen

Versuch 8

Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate : Zellart in %

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch

——— . ——— " " " gefr.+hitzebeh.

sonst. Erl. wie. Abb.18

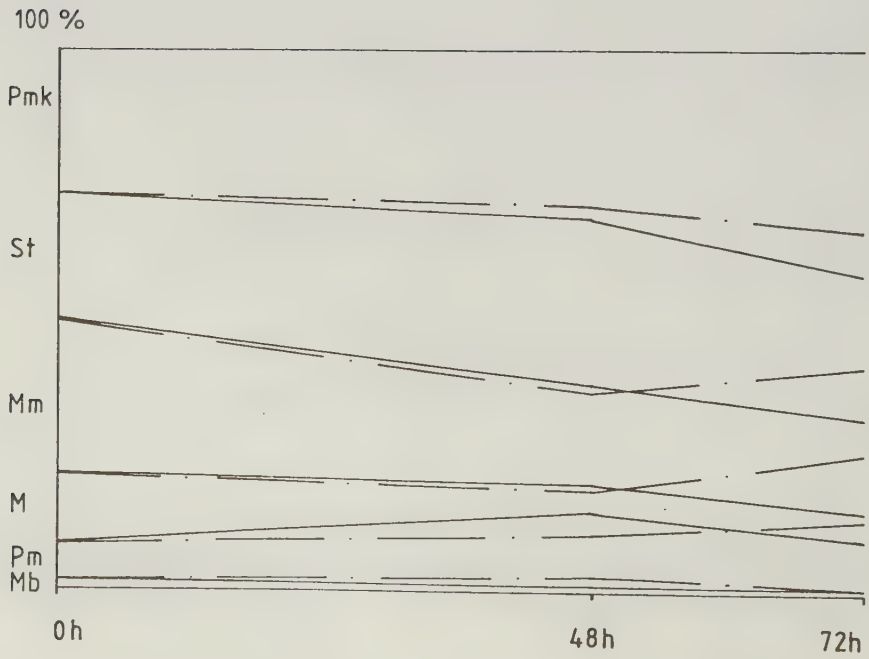


Abb. 29 : Reifungskurven, additiv aufgetragen

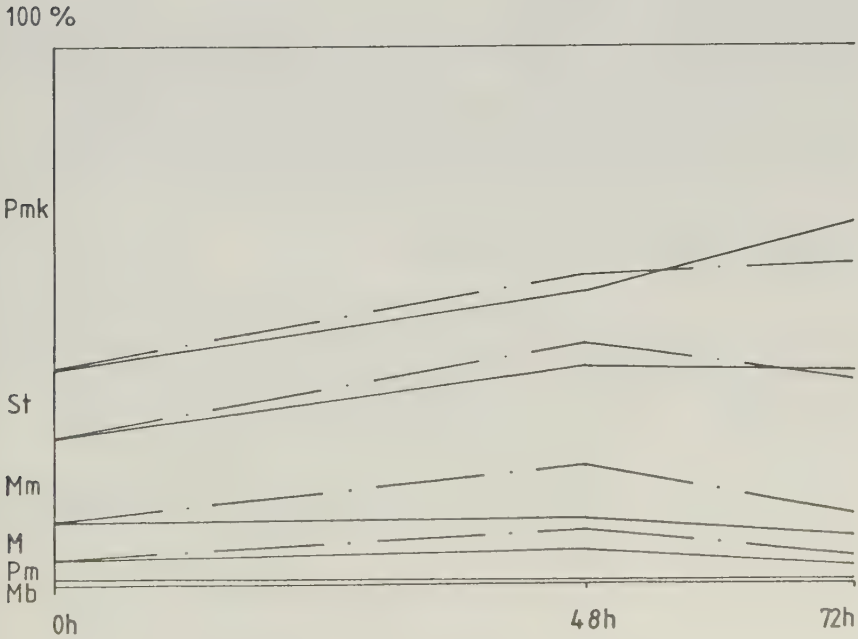
Versuch 9

Abszisse : Kulturzeit in Stunden
Ordinate : Zellart in %

——————— Kultur mit Serumzusatz frisch

——— . ——— „ „ „ gefr. +hitzebeh.

sonst. Erl. wie Abb. 18



3.4. Reifungsindices (Gb/Gz-Ind.)
(Tabelle 2, Abb. 30)

3.4.1. Serumzusatz gefroren
(Vers. 1-6)

Der Reifungsindex der Kulturen mit Serumzusatz gefroren-getaut ist gegenüber den Kulturen mit frischem Serumzusatz in fast allen Fällen, mit Ausnahme Versuch 1, am 2. und 3. Tag sowie Versuch 4, am 3. Tag, eindeutig erniedrigt. Das heißt die teilungsfähigen Zellen nehmen stärker ab, es findet eine beschleunigte Ausreifung statt. Die Signifikanzberechnung mit den absoluten Zellzahlen (Granuloblasten und Granulozyten aller 6 Versuche) ergibt sowohl für 48 als auch für 72 Stunden mit p-Werten kleiner als 0,001 ein hochsignifikantes Ergebnis.
Zur besseren Veranschaulichung wurden in Abb. 30 zu jedem Versuchstag die Gb/Gz Werte, errechnet aus der Summe aller Granuloblasten und der Summe aller Granulozyten, in Verhältnis zu dem Gb/Gz Wert zur Stunde 0 gesetzt, wobei Gb/Gz (0h) = 1 sein soll.

3.4.2. Serumzusatz hitzebehandelt
(Vers. 1-9)

Der Reifungsindex der Kulturen mit Serumzusatz hitzebehandelt ist, mit Ausnahme der Versuche 2 und 5, höher als der Kontrollwert, d.h. die Ausreifung der Zellen ist deutlich verlangsamt. Die Signifikanzberechnung mit den absoluten Zellzahlen aller Versuche ergibt sowohl am 2. als auch am 3. Kulturtag ein hochsignifikantes Ergebnis (p kleiner als 0,001). Siehe auch Abb. 30.

3.4.3. Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt
(Vers. 7-9)

Hier verlaufen die Reifungsindices fast identisch mit den Kontrollwerten, d.h. es besteht kein Unterschied in der Ausreifung gegenüber den Kulturen mit frischem Eigenserum. (siehe auch Reifungskurven Abb. 27 - 29)
Dies wird auch durch die Ergebnisse der Signifikanzberechnung bestätigt: im Vergleich zu den Kulturen mit frischem Serum findet sich kein signifikanter Unterschied, die Ergebnisse der Kulturen mit hitzebehandeltem bzw. gefrorenen Serumzusatz zeigen jeweils hochsignifikante Unterschiede (p kleiner 0,001).

In Tabelle 2 werden die Ergebnisse der Signifikanzberechnung ebenfalls mit Hilfe von Symbolen dargestellt.

Erläuterung:

Ausreifung hochsignifikant beschleunigt ⇈

Ausreifung hochsignifikant verlangsamt ⇊

kein signifikanter Unterschied →

Tab. 2: Reifungsindex aller Versuche [Gb/Gz]

Versuch	Orig.	ES-frisch		-gefroren		-hitzebeh.		-gefr.+hitze	
	0 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
1	0,14	0,53	0,51	0,71	0,72	1,09	0,94		
2	2,92	4,25	3,58	3,00	1,30	2,30	2,48		
3	2,47	0,56	0,52	0,26	0,09	2,94	3,61		
4	0,97	0,46	0,20	0,42	0,24	1,35	1,16		
5	1,32	0,94	0,97	0,48	0,32	0,71	0,60		
6	2,38	0,43	0,66	0,39	0,37	0,61	0,43		
7	0,86	0,85	0,27			0,87	0,55	0,63	0,47
8	1,06	0,67	0,53			0,90	0,72	0,61	0,74
9	0,39	0,96	0,82			1,20	1,02	1,04	0,83
ø	1,39	1,07	0,90	0,88	0,51	1,33	1,28	0,76	0,68
alle GB / alle GZ	1,25	0,78	0,69	0,58	0,40	1,04	0,80	0,73	0,68
Signifik.				↑↑	↑↑	↓↓	↓↓	→	→

Abb.30: Mittlerer Reifungsindex aller 9 Versuche

bezogen auf Gb/Gz [0h] = 1

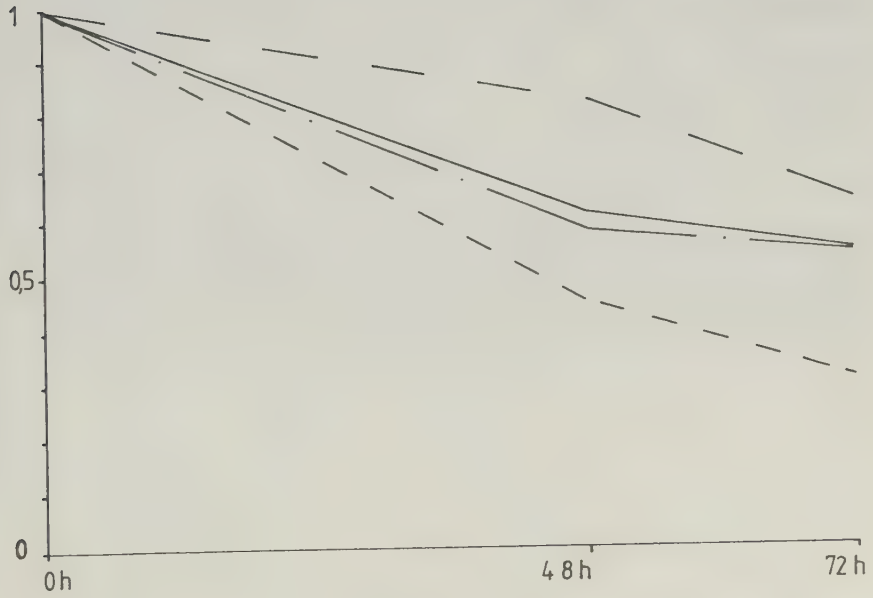
Abszisse: Kulturzeit in Stunden
Ordinate: Gb/Gz - Index

——————— Kulturen mit Serum frisch

— — — — — " " " gefroren

—— —— —— " " " hitzebeh.

——— . ——— " " " gefr.+hitzebeh.



	Orig. 0h	ES-frisch 48h	ES-frisch 72h	gefroren 48h	gefroren 72h	hitzebeh. 48h	hitzebeh. 72h	gefr+hitz. 48h	gefr+hitz. 72h
Gb/Gz-I $\left[\frac{\Sigma\ Gb}{\Sigma\ Gz}\right]$	1,25	0,78	0,69	0,58	0,40	1,04	0,80	0,73	0,68
Gb/Gz-I bez.auf $\frac{Gb}{Gz}$ [0h] = 1	1	0,62	0,55	0,46	0,32	0,83	0,64	0,58	0,54

3.5. Karyologische Kurven (Mitosephasenverteilung)
Abb. 31

In der Abbildung 31 werden für die Mitosephasen folgende Abkürzungen gebraucht:

P = Prophase
fM = frühe Metaphase
sM = späte Metaphase
A = Anaphase
T = Telophase
R = Rekonstruktionsphase

Gesamtzahl der Mitosen

Serumzusatz frisch:	91
" -gefroren:	117
" -hitzebeh.:	115
" -gefr.+hitzebeh.:	57

Der Verlauf der Karyologischen Kurven zeigt außer einer starken Zunahme von späten Metaphasen in den Kulturen mit Serumzusatz gefroren (79,8 % gegenüber 54,2 % bei den Kulturen mit frischem Serum) keine weiteren Auffälligkeiten.

Abb.31: Prozentuale Mitosephasenverteilung

Abszisse: Mitosephasen

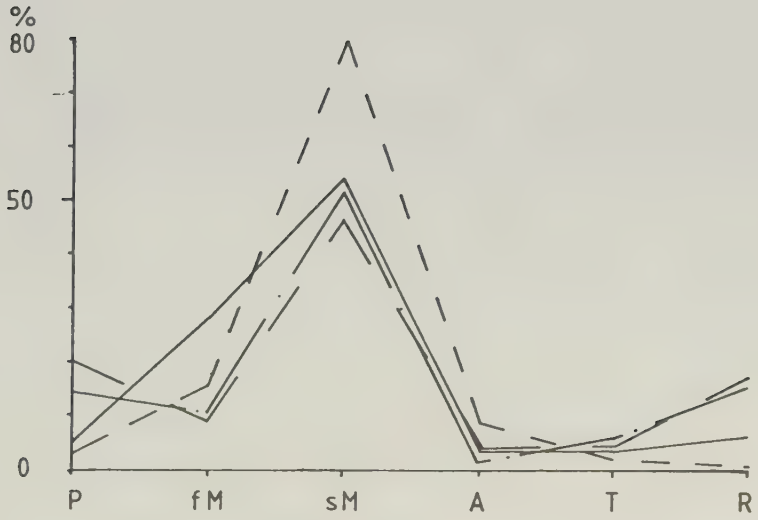
Ordinate: Anzahl in %

——————— Kontrollkultur [ES-frisch]

— — — — — Kultur mit Serumzus.gefroren

—— —— —— " " " hitzebeh.

———— . ———— " " " gefr.+hitzebeh.



3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Vergleich zu den Kulturen mit frischem Eigenserum zeigen die übrigen Kulturen folgende Abweichungen in ihrem Proliferationsverhalten:

a) Die Kulturen mit Serumzusatz gefroren zeigen deutlich erhöhte Mitose-Indices und eine deutlich beschleunigte Ausreifung.

b) Die Kulturen mit Serumzusatz hitzebehandelt zeigen in den Mitose-Indices keine signifikante Abweichung, reifen aber deutlich langsamer aus.

c) Die Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt haben deutlich erhöhte Mitose-Indices, zeigen aber keine Abweichung im Ausreifungsverhalten, jedoch liegen die Mitose-Indices noch signifikant niedriger als mit nur gefrorenem Serumzusatz und die Ausreifung ist hochsignifikant beschleunigt gegenüber den Kulturen mit hitzebehandeltem Serumzusatz.

4. Diskussion

Zur Untersuchung von physikalischen Einflüssen auf die Regulationsfaktoren der Granulozytopoese im Blut von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie wurde die Suspensionskulturmethode nach Boll (10) verwandt. Diese Methode hat, neben der bereits beschriebenen größeren Ähnlichkeit zu den in vivo Bedingungen, gegenüber der Agar-Kolonie-Methode den weiteren entscheidenden Vorteil, daß die Möglichkeit besteht, die beiden Parameter der Proliferationskinetik, Regeneration und Ausreifung, getrennt zu beurteilen. Dies macht verständlich, daß die im folgenden zitierten Ergebnisse anderer Autoren nicht immer direkt mit den Resultaten dieser Arbeit verglichen werden können.

Analysiert man die Ergebnisse der vorliegenden Versuche, so kommt man zu dem Schluß, daß auch bei der chronisch myeloischen Leukämie noch gewisse Regulationsmechanismen der Granulozytopoese wirksam sind, und zwar sowohl hemmende als auch stimulierende. Es werden die bereits in der Fragestellung erwähnten Ergebnisse von Boll et al. (1979) (11) bestätigt, wonach im Serum von Patienten mit CML ein hitzestabiler, die Regeneration stimulierender Faktor, welcher aber nicht die Ausreifung fördert, vorhanden ist. Ebenso, daß die Proliferationsrate von CML-Blutzellen, gemessen am Mitose-Index, in gefroren getautem CML-Serum deutlich höher ist als in frischem autologen CML-Serum (12). Desweiteren wird die Existenz eines proliferationshemmenden Faktors im frischem Serum bestätigt, der jedoch im Gegensatz zu o.g. Ergebnis als hitzestabil befunden wird.

Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen sich aber nur erklären, wenn man die Existenz von mindestens 3 (evtl. 4) verschiedenen Regulationsfaktoren mit folgenden Eigenschaften annimmt:

1. Faktor: Regeneration fördernd - hitzestabil und durch Gefrieren demaskiert
2. Faktor: Ausreifung fördernd - hitzeinaktivierbar
3. Faktor: Regeneration hemmend - frostinaktiviert und hitzestabil
4. Faktor: Ausreifung hemmend - frostinaktiviert und hitzestabil .

Faktor 3 und 4 unterscheiden sich mit der hier verwendeten Methode nicht in ihren Eigenschaften, so daß es sich dabei eventuell um einen einzigen Faktor handeln könnte, welcher sowohl die Regeneration als auch die Ausreifung hemmt. Die Ergebnisse mit Trypsinbehandlung (48) in parallel angelegten Versuchen sprechen jedoch dafür, daß diese beiden Faktoren sich bei Behandlung mit proteolytischen Enzymen in ihren Eigenschaften unterscheiden. Deswegen muß man doch von insgesamt vier verschiedenen Faktoren ausgehen. Ich will nun versuchen, diese Hypothese näher zu erläutern.

Kultiviert man Blutzellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie in autologem frischen Medium, so ergibt sich ein ähnlich niedriger Mitose-Index, wie er im Knochenmark in vivo bekannt ist. Dies ändert sich aber, sobald die Zellen in autologem gefroren getauten Serum kultiviert werden. Die Regeneration der Zellen, gemessen am Mitose-Index, steigt hochsignifikant an. Ebenso läßt sich eine hochsignifikante Beschleunigung der Ausreifung feststellen. Eine Erklärung hierfür wäre: Die hemmenden Faktoren sind frostempfindlich und durch ihren Wegfall können die Stimulationsfaktoren ihren Einfluß entfalten.

Anders verhält es sich in den Kulturen mit hitzebehandeltem Serum. Man findet keine Veränderung der Mitose-Rate, sondern lediglich eine signifikante Verlangsamung der Ausreifung, d.h. der die Ausreifung fördernde Faktor wird durch Hitze inaktiviert.

Interessant wird es nun in den Kulturen mit Serum welches beiden Behandlungen unterworfen wurde. Man findet genau die Summe der zuvor beschriebenen Ergebnisse: Die hemmenden Faktoren sind durch Tieffrieren inaktiviert, der die Ausreifung fördernde Faktor ist durch Hitzeeinwirkung zerstört, übrig bleibt alleine der regenerationsfördernde Faktor welcher gegenüber beiden Behandlungen unempfindlich ist und dessen Wirkung sich im alleinigen Anstieg der Mitose-Rate ohne beschleunigte Ausreifung zeigt. Der Stimulationsfaktor der Ausreifung hat offensichtlich ein höheres Molekulargewicht als der Stimulationsfaktor der Regeneration da er durch Hitzeeinwirkung inaktiviert wird, was ja vor allem bei Makromolekülen der Fall ist. Ferner findet Schneider (48), daß der die Ausreifung hemmende Faktor durch Trypsin inaktiviert wird, daß es sich also höchstwahrscheinlich um ein Protein handeln muß.

Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen findet Granström (27), daß zweimaliges Frieren und Auftauen die Stimulationsaktivität von menschlichem Normalserum auf Agar-Kulturen nicht verändert, jedoch 5 maliges Frieren und Auftauen die Aktivität halbiert, und erklärt dieses Phänomen mit einer Zunahme von Lipoprotein-Inhibitoren des CSF, da anschließende Behandlung mit Chloroform, welches alle Lipoproteine entfernt, die Stimulationsaktivität wieder voll herstellt. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse wäre, daß im Serum von Patienten mit CML andere Hemmstoffe als in normalem Serum in hoher Konzentration vorhanden sind, eventuell freigesetzt aus der großen Anzahl reifer Granulozyten, welche im Gegensatz zu den normalerweise vorhandenen Hemmstoffen durch Tieffrieren inaktiviert und nicht aktiviert werden. Wenn auch die Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Kulturmethode nicht ohne weiteres vergleichbar sind, so wäre es doch interessant zu kontrollieren ob es sich bei den hier festgestellten Hemmstoffen der Granulozytopoese auch um Lipoproteine handelt. Dies wäre

durch Behandlung mit Chloroform möglich und müßte ähnliche Kulturergebnisse liefern wie das Tieffrieren und anschliessende Wiederauftauen des Serumzusatzes.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, fanden Bolin und Robinson (5) einen Faktor im menschlichen Serum, welcher die Kapazität besitzt, menschliche mononukleäre Zellen zu gesteigerter Produktion von CSA zu stimulieren. Dieser Faktor wurde als hitzelabiles Protein mit einem höheren Molekulargewicht als CSA charakterisiert. Es wäre denkbar, daß dieser Faktor mit dem hier nachgewiesenen fördernden Faktor der Ausreifung identisch ist, bei dem es sich ebenfalls um ein hitzelabiles Molekül handelt, was in der verlangsamten Ausreifung in den Kulturen mit hitzebehandeltem Serumzusatz zum Ausdruck kommt. In Einklang damit stehen auch die Ergebnisse von Skoblo (49), der in einem Versuch eine deutliche Ausreifungshemmung von CML-Knochenmarkszellen in hitzebehandeltem CML-Serum gegenüber nicht hitzebehandeltem CML-Serum findet. Darüberhinaus wird auch eine Erniedrigung des Mitose-Index gefunden, welche sich aber in unseren Versuchen mit CML-Blutzellen nicht bestätigt.

Di Persio et al. (20) weisen CSA-Aktivitäten nach, die aus CGT, einer menschlichen Monozyten-ähnlichen Zellinie, freigesetzt werden. Eine CSA, die das Wachstum von neutrophilen, neutrophil-monozytären und eosinophilen Kulturen aus menschlichem Knochenmark stimuliert und ein Molekulargewicht von 30 000 hat, kann durch Antikörper gegen humanes Urin-CSF neutralisiert werden. Es handelt sich um ein Protein, welches durch Perjodatbehandlung inaktiviert wird und bei 56 ^{o}C hitzeresistent ist. Möglicherweise handelt es sich bei dieser CSA um den in dieser Arbeit nachgewiesenen regenerationsfördernden Faktor. Dies würde allerdings den Ergebnissen von Burgess und Metcalf (17) widersprechen, welche die Ansicht vertreten, daß der die Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierende Faktor sowohl die Proliferation als

auch die Differenzierung fördert. Hier jedoch wird nachgewiesen, daß es sich bei den Stimulatoren der Regeneration und Ausreifung um zwei verschiedene Stoffe handelt, wobei der Stimulationsfaktor der Ausreifung durch Hitzeeinwirkung inaktiviert wird, im Gegensatz zum Stimulationsfaktor der Regeneration. Allerdings ist noch nicht klar, inwieweit die hier beschriebenen Regulationsfaktoren bei CML mit den Faktoren in normalem Serum identisch sind. Überhaupt existieren sehr verschiedene Aussagen über die noch vorhandenen Regulationsmechanismen bei der CML. Golde et al. (24) stellen fest, daß in der chronischen Phase dieser Krankheit die myeloproliferative Kapazität erhöht ist, wohingegen die Ausreifung der Zellen normal verläuft. Dies läßt sich mit den Überlegungen von Boll (11) und Lord et al. (33) vereinbaren, wonach die Krankheit von der Pluripotenten Stammzelle ausgeht, da sich das Philadelphia Chromosom auch in erythroiden und megekaryozytischen Zellen nachweisen läßt. Es wird diskutiert, ob die Ursache der CML in einem partiellen Verlust der Stammzell-Hemmung liegen kann, was dazu führt, daß sich der Ph_1-Clon im Proliferationsspeicher ausdehnt, während die normalen Stammzellen weiterhin den negativen Rückkopplungsmechanismen unterliegen.

Berthier et al (2) weisen nach, daß die aktive Fraktion des Proliferationsspeichers in der chronischen Phase der CML nicht durch die Expansion der Granulozytenpopulation vermindert wird.

Foster et al. (22) finden, daß CSF im Serum von Patienten mit CML erhöht ist, wohingegen Douady et al. (21) sowie Golman et al. (25) feststellen, daß die Sekretion von CSF aus feeder-layers von CML-Leukozyten hochgradig vermindert ist. Broxmeyer et al. (14) stellen fest, daß polymorphkernige Zellen von CML-Patienten in ihrer CIA Produktion (wie in der Einleitung beschrieben, ein Stoff der die Freisetzung von CSF hemmt) normalen Polymorphkernigen unterlegen sind. Ebenso sollen bei der CML die Target-Zellen für

CIA weniger empfindlich sein. Dagegen weisen Stryckmanns et al. (50) nach, daß Granulozyten von CML-Patienten eine normale knochenmarkhemmende Aktivität besitzen, so daß der Regulationsdefekt nicht den Polymorphkernigen angelastet werden kann.

All diese Ergebnisse sind aber nicht in der Lage, den bei der chronisch myeloischen Leukämie bestehenden Regulationsdefekt exakt aufzuklären. In unseren Versuchen wird nachgewiesen, daß bei der CML noch gewisse Regulationsmechanismen wirksam und daran mindestens drei, wahrscheinlich vier, Faktoren mit unterschiedlichen Eigenschaften beteiligt sind. Es wäre nun wünschenswert die chemische Struktur dieser Substanzen aufzuklären, um dann die Wirkung einer definierten Reinsubstanz untersuchen zu können. Leider sind aber die Substanzmengen im Serum so klein, daß es mit den heutigen Methoden noch nicht gelungen ist, einen Stoff wie z.B. das Granulozytenchalon zu identifizieren, obwohl über seine Wirkungsweise und Eigenschaften eine Fülle von Information besteht (47). Mit wenigen Ausnahmen wie z.B. Prostaglandin E (30) und Lactoferrin (15) gilt ähnliches wohl für die meisten Regulationsstoffe der Granulozytopoese.

5. Zusammenfassung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde in 9 Versuchen, mit Hilfe der Suspensionskulturmethode nach Boll (10), die Wirkung von physikalischen Einflüssen auf die Regulationsfaktoren der Granulozytopoese im Blut von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie untersucht. Insgesamt liegen der Arbeit die Differenzierung von ca 126 000 Zellen der weißen Reihe und der zugehörigen Mitosen zugrunde.

In den Kulturen mit Serumzusatz gefroren zeigt sich eine hochsignifikante Erhöhung des Mitose-Index sowie eine hochsignifikante Beschleunigung der Ausreifung.
In den Kulturen mit hitzebehandeltem Serumzusatz ergab sich eine hochsignifikante Verzögerung der Ausreifung und keine Änderung der Mitose-Rate.
In den Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt ergab sich eine signifikante Steigerung der Mitose-Rate und keine Abweichung im Ausreifungsverhalten.
(Jeweils im Vergleich zu den Kulturen mit frischem Eigenserum)

Diese Ergebnisse werden mit der Anwesenheit von hemmenden und fördernden Faktoren, sowohl der Ausreifung als auch der Regeneration erklärt. Die Ergebnisse werden mit denen anderer Autoren verglichen, Übereinstimmungen und Abweichungen werden diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Beelitz, H.J. — Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Der Mathematikunterricht 3/60 Ernst Klett Verlag Stuttgart

2. Berthier, R. Douady, F. Hollard, D. — Cellular Factors Regulating Granulopoiesis in Myeloid Leukemia. Blood Cells 3, 461-474 (1977)

3. Bierman, H.R. — Characteristic of Leukopoietin G in Animals and Man. Ann. N.Y.Acad.Sci. 113, 753 (1964)

4. Bierman, H.R. Hood, J.E. — Study of Granulopoietin from Endotoxin-Stimulated Mouse Plasma. Brit. J. Haemat. 22,145 (1972)

5. Bolin, R.W. Robinson, W.A. — Control Factors of Granulopoiesis in Human Serum. American Journ. of Hemat. 6, 1-10 (1979)

6. Boll, I. — Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulozytopoese. Fol.Haemat. 91, 172, Leipzig 1969

7. Boll, I. — Leitfaden der cytologischen Knochenmarksdiagnostik, Haematologie und Bluttransfusion. J.F. Lehmanns Verlag München 2. Aufl. 1973

8. Boll, I. — Granulozytopoese - Morphologie, Kinetik und Funktion. Handbuch der Inneren Medizin II, 3, 193 (Hrsg. H. Begemann) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1976

9. Boll, I. Sterry, K. Maurer, H.R. — Evidence of a Granulocyte Chalone Effect as Demonstrated by Proliferation Kinetics of Human Bone Marrow Cultures. 25. Meeting of the European Tissue Culture Club Basel 1977

10. Boll, I. — Knochenmarkkulturen, in: Das Knochenmark, Hrsg. W.Queisser, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1978

11. Boll, I.T.M. et al. — Serum Factors Influencing Human Granulocytopoietic Proliferation in Clot Cultures. Exp. Hemat. Vol. 7, No. 3, 441 (1979)

12. Boll, I. — Haematologischer Kongress Montreal 1980

13. Bradley, T.R. Metcalf, D — The Growth of Mouse Bone Marrow Cells in Vitro. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287 (1966)

14. Broxmeyer, H.E. Mendelsohn, N. Moore, M.A.S. — Abnormal Granulocyte Feedback Regulation of Colony Forming and Colony Stimulating Activity - Producing - Cells From Patients with Chronical Myeloic Leukemia.

14. Leukemia Research, Vol. 1, No. 1, 3 - 12, Pergamon Press 1977

15. Broxmeyer, H.E. Gentile, P. Bognacki, J. Ralph, P. Lactoferrin, Transferrin and Acidic Isoferritins: Regulatory Molecules with Potential Therapeutic Value in Leukemia. Blood Cells 9, 83 - 105 (1983)

16. Bullough, W.S. Laurence, E.B. The Control of Epidermal Mitotic Activity in the Mouse. Proc. R.Soc.Biol., 151, 517, (1960)

17. Burgess, A.W. Metcalf, D. The Nature and Action of Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factors Blood, Vol. 56, No. 6, Dec. 1980

18. Chan, S.H. Metcalf, D. Stanley, E.R. Stimulation and Inhibition by Normal Human Serum of Colony Formation in Vitro by Bone Marrow Cells. Brit. J. Haemat. 20, 329 (1971)

19. Dao, C. et al. Normal Human Bone Marrow Cultures in Vitro: Cellular Composition and Maturation of the Granulocytic Colonies. Brit. J. Haemat. 37, 127 (1977)

20. Di Persio, J.F. et al. The Fractionation, Characterization and Subcellular Lokalization of Colony-Stimulating Activities Released by the Human Monocyte-Like Cell Line, CGT Blood, Vol. 56, No. 4, Oct. 1980

21. Douady, F. et al. Etude de la production de CSF par les leucocytes de sujets normaux et de sujets attaints de leucémie myéloide chronique. Cultures de cellules Hématopoiétiques in vitro Vol. 42, Ins. 1975, 139

22. Foster, R. et al. Bone Marrow Colony Stimulating Activity in Human Sera. Results of Two Independent Surveys in Buffalo and Melbourne. Brit. J. Haemat. 15, 147 (1968)

23. Fuchs, G. Mathematik für Mediziner und Biologen, Springer Berlin 1969

24. Golde, D.W. Byers, L.A. Cline, M.J. Chronic Myelogenous Leukemia Cell Growth and Maturation in Liquid Culture. Cancer Research 34, 419, Feb. 1974

25. Golman, J.M. Th´ng, K.H. Lowenthal, R.M. In Vitro Colony Forming Cells and Colony Stimulation Factor in Chronic Granulocytic Leukemia. Brit. J. Cancer 30, 1, (1974)

26. Gordon, A.S. et al. Evidence for a Circulating Leukocytosis Inducing Factor (LIF). Acta Haemat. Basel 23, 323 (1960 a)

27. Granström, M. Conditions Influencing Inhibitors of the Colony Stimulating Factor. Exp. Cell Res. 87, 307 (1974)

28. Greenberg, P.L.
Steed, S.M.
Splenic Granulocytopoiesis and Production of Colony-Stimulating Activity in Lymphoma and Leukemia.
Blood, Vol. 57, No. 1, Jan. 1981

29. Komiya, E.
Nachschub, Verteilung und Untergang der Leukozyten.
Handbuch der ges. Hämatologie Bd. 2
2. Teil, 1. Halbband, S. 83
München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1959

30. Kurland, J.I.
et al.
Role for Monocyte - Macrophage - derived Colony-Stimulating Factor and Prostaglandin E in the Negative Feedback Control of Myeloid Stem Cell Proliferation.
Blood, Vol. 52, No. 2, 388 (1978)

31. Lajtha, L.G.
The Culture of Bone Marrow Cells in Vitro.
Brit. Med. Bull. 15, 47, (1959)

32. Lord, B.I.
Modification of Granulopoietic Cell Proliferation by Granulocyte Extracts.
Boll. Inst. Sieroter. Milan. 55, 187, (1975)

33. Lord, B.I.
et al.
Proliferation Regulators in Haemopoietic Cell Populations.
Blood Cells 3, 451 (1977)

34. Lusis, A.J.
Quon, D.H.
Golde, D.W.
Purification and Characterization of a Human T-Lymphocyte-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor.
Blood, Vol. 57, No.1, (1981)

35. Menkin, V. — Factors Concerned in the Mobilisation of Leukocytes in Inflammation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 59, 956 (1955)

36. Metcalf, D. Moore, M.A.S. — Haemopoietic Cells Amsterdam - London North Holland Publishing Company 1971

37. Paukovits, W.R. Hinterberger, W. — Molecular Weight and some Chemical Properties of the Granulocyte Chalone Blut 37, 7, (1978)

38. Pelus, L.M. et al. — Regulation of Macrophage and Granulocyte Proliferation. Journ. Exp. Med. 150, 277 (1979)

39. Pluznik, D.H. Sachs, L. — The Induction of Clones of normal Mast Cells by a Substance from Conditioned Medium. Exp. Cell Res. 43, 553 (1966)

40. Robinson, W.A. Mangalik, A. — Regulation of Granulopoesis: Positive Feed - Back. Lancet 7, 742 (1972)

41. Ruhenstroth-Bauer, G. et al. — Zur Chemie des Granulozyten ausschwemmenden Faktors der Milz. X. intern. Haemat. Kongreß Stockholm 1964

42. Rytömaa, T. Kiviniemi, K. — Regulation System of Blood Cell Production, Control of Cellular Growth in Adult Organism. Edited by H. Teir and T. Rytömaa pp 106, Acad. Press N. Y. 1967

43. Rytömaa, T.
Kiviniemi, K.
Control of Granulocyte Production, I Chalone and Antichalone, Two Specific Humoral Regulators.
Cell Tiss. Kinet. 1, 329, (1968 a)

44. Rytömaa, T.
Kiviniemi, K.
Control of Granulocyte Production, II Mode of Action of Chalone and Antichalone.
Cell Tiss. Kinet. 1, 341, (1968 b)

45. Rytömaa, T. et al.
Effect of Granulocyte Chalone on Acute and Chronic Granulocytic Leukaemia in Man. Report of seven Cases.
Scand. J. Haemat., Kopenhagen 1976

46. Rytömaa, T. et al.
Effect of Granulocyte Chalone on Acute Myeloid Leukaemia in Man. A Follow - up Study.
Lancet I, 771, (1977 I)

47. Rytömaa, T.
Chalones and Blood Cells.
The Year in Hematology 1978
Plenum Med. Book Company
N.Y. and London

48. Schneider, J.R.
Diss. in Vorbereitung
Berlin

48. Shadduck, R.K.
Granulocyte Stimulating and Inhibiting Activity from Neutrophils (PMN's): Possible Dual Feedback Control of Granulopoiesis.
Blood, 38, 820 (1971)

49. Skoblo, M.R. Die Beeinflussung der Proliferation von menschlichen Knochenmarkzellen durch Serum von Patienten mit CML vor und nach Hitzebehandlung. Diss. Berlin 1980

50. Stryckmanns, P.A. et al. Colony-Inhibiting Activity of PMN-Cells in CML. Blood Cells 3, 493 (1977)

51. Sumner, M.A. et al. The Growth of Bone Marrow Cells in Liquid Culture. Brit. J. Haemat. 23, 221, (1972)

52. Teir, H. Rytömaa, T. A Feedback Regulation System of Granulocytopoiesis. Sangre (Barcelona) 9, 418 (1964)

53. Wendt, F. Neue Ergebnisse der Pyrogenforschung. Deutsche Med. Wschr. 84, 2084 (1959a)

54. Willemze, R. et al. Marrow Culture in Diffusion Chambers in Rabbits: III Effect of Endotoxin and Leukocyte - Products on Cell - Production. Am. J. Haemat. 7, 33 (1979)

Anhang

Ergebnisse der Signifikanzberechnungen

1. Kulturen mit Serumzusatz gefroren : Kulturen mit ES frisch

MI 48 h

gefroren:	59 Mitosen	2681 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2740
frisch:	60 Mitosen	6427 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 6487
Chi^2: 22,8		$p<0,001$	

MI 72 h

gefroren:	58 Mitosen	2256 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2314
frisch:	31 Mitosen	6237 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 6268
Chi^2: 66,5		$p<0,001$	

Gb/Gz 48 h

gefroren:	2998 Blasten	5189 Zyten	Zellzahl: 8187
frisch:	6487 Blasten	8304 Zyten	Zellzahl: 14791
Chi^2: 113,9		$p<0,001$	

Gb/Gz 72 h

gefroren:	2314 Blasten	5791 Zyten	Zellzahl: 8105
frisch:	6268 Blasten	9041 Zyten	Zellzahl: 15309
Chi^2: 350,5		$p<0,001$	

2. Kulturen mit Serumzusatz hitzebehandelt : ES frisch

MI 48 h

hitzebeh.:	80 Mitosen	6841 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 6921
frisch:	60 Mitosen	6427 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 6487
Chi^2: 1,7		$p = 0,2$	

MI 72 h

hitzebeh.:	35 Mitosen	5768 Nicht-Mitosen	Zellzahl:5803
frisch:	31 Mitosen	6237 Nicht-Mitosen	Zellzahl:6268
Chi^2: 0,65		p = 0,42	

Gb/Gz 48 h

hitzebeh.:	6921 Blasten	6677 Zyten	Zellzahl:13598
frisch:	6487 Blasten	8304 Zyten	Zellzahl:14791
Chi^2: 140,9		p < 0,001	

Gb/Gz 72 h

hitzebeh.:	5803 Blasten	7255 Zyten	Zellzahl:13058
frisch:	6268 Blasten	9041 Zyten	Zellzahl:15309
Chi^2: 35,3		p < 0,001	

3. Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt :

ES frisch

MI 48 h

g+h:	24 Mitosen	2378 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2402
frisch:	10 Mitosen	2526 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2536
Chi^2: 6,6		p = 0,01	

MI 72 h

g+h:	33 Mitosen	2905 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2938
frisch:	31 Mitosen	6237 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 6286
Chi^2: 11,6		p < 0,001	

Gb/Gz 48 h

g+h:	2402 Blasten	3299 Zyten	Zellzahl: 5701
frisch:	6487 Blasten	8304 Zyten	Zellzahl:14791
Chi^2: 5,0		0,05 > p > 0,01	

Gb/Gz 72 h

g+h:	2938 Blasten	4329 Zyten	Zellzahl: 7267
frisch:	6286 Blasten	9041 Zyten	Zellzahl:15309
Chi^2: 0,54		p > 0,5	

4. Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt :
Serumzusatz hitzebehandelt

MI 48 h

g+h:	24 Mitosen	2378 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2402
hitze:	80 Mitosen	6841 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 6921
Chi^2: 0,40		p = 0,5	

MI 72 h

g+h:	33 Mitosen	2905 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2938
hitze:	35 Mitosen	5768 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 5803
Chi^2: 6,8		0,001 < p < 0,01	

Gb/Gz 48 h

g+h:	2402 Blasten	3299 Zyten	Zellzahl: 5701
hitze:	6921 Blasten	6677 Zyten	Zellzahl:13598
Chi^2: 123,6		p < 0,001	

Gb/Gz 72 h

g+h:	2938 Blasten	4329 Zyten	Zellzahl: 7267
hitze:	5803 Blasten	7255 Zyten	Zellzahl:13058
Chi^2: 30,6		p < 0,001	

5. Kulturen mit Serumzusatz gefroren und hitzebehandelt :
Serumzusatz gefroren

MI 48 h

g+h:	24 Mitosen	2378 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2402
gefroren:	59 Mitosen	2681 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2740
Chi^2: 10,7		0,001 < p < 0,01	

MI 72 h

g+h:	33 Mitosen	2905 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2938
gefroren:	58 Mitosen	2256 Nicht-Mitosen	Zellzahl: 2314
Chi^2: 14,5		p < 0,001	

Gb/Gz 48 h

g+h:	2402 Blasten	3299 Zyten	Zellzahl: 5701
gefroren:	2998 Blasten	5189 Zyten	Zellzahl: 8187
Chi^2: 43,0		$p < 0,001$	

Gb/Gz 72 h

g+h:	2938 Blasten	4329 Zyten	Zellzahl: 7267
gefroren:	2314 Blasten	5791 Zyten	Zellzahl: 8105
Chi^2: 240,4		$p < 0,001$	

Lebenslauf

Am 4. März 1955 wurde ich als Sohn des Zimmermannes Heinz Wendel und seiner Ehefrau Margarete in Stein-Neukirch (Westerwald) geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule in Stein-Neukirch und der Realschule in Burbach absolvierte ich eine Ausbildung zum Chemielaboranten und war anschließend in diesem Beruf tätig.
Von 1974 - 1976 besuchte ich das Siegerland - Kolleg in Hüttental - Weidenau , welches ich mit dem Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife abschloß. Anschließend begann ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.
1980 heiratete ich die Studentin der Ethnologie und Sinologie Maria Wengenroth. 1982 wurde unser Sohn Johann Philipp geboren.
Den letzten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich im April 1983 in Berlin ab, im Mai 1983 erhielt ich die Approbation als Arzt.
Seit Juli 1983 bin ich als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Brüderkrankenhauses in Montabaur beschäftigt.

Für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit möchte ich mich bei Frau Professor Boll recht herzlich bedanken.
Mein Dank gilt ebenso Herrn Professor Salnikow, der für uns die Serumfraktionen herstellte und uns beratend zur Seite stand.
Nicht vergessen möchte ich,mich an dieser Stelle auch bei Herrn Professor Fuchs für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Arbeit zu bedanken.